



ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE
UNIVERSITE DE LIEGE
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE
DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES
SERVICE DE MYCOLOGIE VETERINAIRE

Contribution à l'étude de la réponse immune au cours d'une infection à *Microsporium canis* et établissement d'un modèle murin de dermatophytose

Contribution to the study of immune response during *Microsporium canis* infection and establishment of a dermatophytosis mouse model

Ludivine CAMBIER

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE DOCTEUR EN
SCIENCES VETERINAIRES**

ANNEE ACADEMIQUE 2013-2014

« Le savoir est la seule matière qui s'accroît quand on la partage ».

Socrate

Au terme de ce travail, je tiens tout d'abord à remercier mon promoteur, le **Professeur Bernard Mignon**, pour ses précieux conseils et son aide tout au long de la réalisation de ce doctorat.

Merci à mon co-promoteur, le **Professeur Nadine Antoine**, pour ses conseils avisés et son aide dans le domaine de l'histologie et de la culture cellulaire.

Merci au **Professeur Bertrand Losson** de m'avoir accueillie dans son laboratoire.

Merci aux membres de mon comité de thèse, le **Professeur Laurent Gillet** et le **Docteur Benjamin Dewals**, pour leur extrême gentillesse et leur disponibilité quand je venais leur demander conseil.

Je tiens également à remercier mes anciennes collègues de bureau, **Aline Baldo** et **Anne Mathy** sur lesquelles j'ai pu compter dès mon arrivée dans le service.

Un merci particulier à **Tatiana Bagut**, ma dernière compagne de bureau. Sa générosité, sa sympathie et sa gentillesse étaient toujours au rendez-vous.

Merci à **Jessica Collard** pour la relecture approfondie de nombreux documents.

Merci également à tous les membres du service de Mycologie. En particulier, **Marie-Pierre Heinen**, avec laquelle je peux discuter Immuno, PCR en temps réel et plein d'autres choses moins professionnelles. Merci aussi à **Astrid Freichels**, toujours souriante et pétillante ainsi qu'à **Etienne Baise**, qui grâce à son savoir et son expérience, m'a fourni une aide précieuse en particulier dans l'écriture du projet WB-Health.

Merci à tous les membres du service de Parasitologie. Tout d'abord, à **Françoise Maréchal** qui m'a chaleureusement accueillie au sein du laboratoire et sur laquelle j'ai pu compter quand j'en avais besoin. Merci aussi aux plus anciens, **Yannick Caron**, **Céline Cavadino**, **Laetitia Lempereur**, **François Smeets** et aux plus nouveaux, **Romain Abos**, **Caroline Vanvinckenroye** et **Elodie Renard**.

Merci à tous les membres du service d'Histologie. Je pense particulièrement à **Vinciane Toppets** qui m'a soutenue et encouragée tout au long de ce travail. Merci aussi à **Joëlle Piret** ainsi qu'à **Céline Tonus** et **Olivier Waroux**.

Je tiens aussi à remercier **Alodie Weatherspoon** avec laquelle j'ai pu partager mon goût pour la recherche et qui aurait fait, j'en suis sûre, une super collègue de bureau.

Merci aussi à **Valérie Defaweux** pour son dynamisme et ses conseils.

Merci à l'ensemble des vétérinaires ayant contribué à la réalisation de ce travail et sans qui ces expériences n'auraient pas pu être réalisées.

Merci au Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA) pour la bourse qui m'a été octroyée.

Merci à **mes parents** sans lesquels la réalisation de cette thèse n'aurait pas été possible et à toute ma **famille** pour son soutien.

Je tiens à remercier particulièrement mon époux, **Benoît** pour sa patience et son soutien qui m'ont beaucoup aidé dans les moments plus difficiles et la joie de vivre qu'il m'apporte tous les jours.

Enfin, merci à notre fille, **Lucie**, notre petite merveille qui a chamboulé notre vie et nous a donné une autre raison de vivre. Déjà dans mon ventre, elle a dû supporter le stress de la préparation de cette thèse et maintenant encore, elle est de temps en temps bercée de dermatophytes et d'immunité antifongique. Déjà ses petits sourires et ses petites mimiques nous comblent de joie chaque jour.

Liste des abréviations

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNm	ARN messager
ARNr	ARN ribosomal
CD	<i>cluster of differentiation</i> , cluster de différenciation
CLR	<i>C-type lectin receptor</i> , récepteur à lectine de type C
CMF-HBSS	<i>calcium and magnesium-free Hank's buffered salt solution</i>
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	cellule présentatrice d'antigène
CR	<i>complement receptor</i> , récepteur du complément
DC	<i>dendritic cell</i> ; cellule dendritique
DC-HIL	<i>dendritic cell-associated heparin sulfate proteoglycan-dependent integrin ligand</i>
DCP	<i>dendritic cell progenitor</i>
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin</i>
DPP	gène d'une dipeptidyl-peptidase
Dpp	dipeptidyl-peptidase
DTH	<i>delayed type hypersensitivity</i> , hypersensibilité de type retardé
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
Foxp3	<i>forkhead box protein-3</i>
GAPDH	glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase
GATA3	<i>guanine adenine thymine adenine binding protein 3</i>
G-CSF	<i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GRO α	<i>growth-related oncogene alpha</i>
ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i>
IFN	interféron
Ig	immunoglobuline
IHEM	Institut d'Hygiène et d'Epidémiologie-Mycologie
IKK	<i>I kappa B kinase</i>
IL	interleukine
iNOS	<i>inducible nitric oxide synthetase</i>
IRAK	<i>IL-1 receptor-associated kinase</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
KO	<i>knockout</i>
LILA	<i>lipid-like leukocyte activator</i>
LPS	lipopolysaccharide
MAL	<i>MyD88 adapter-like</i>
MEP	gène d'une métalloprotéase
Mep	métalloprotéase
MPLA	<i>monophosphoryl lipid A</i>
MyD88	<i>myeloid differentiation factor 88</i> , facteur de différenciation myéloïde-88
NADPH	nicotinamide-adénine dinucléotide phosphate réduit
NET	<i>neutrophil extracellular trap</i>
NF κ B	<i>nuclear factor-kappa B</i>
NLR	<i>(NOD)-like receptor</i> , récepteur de type NOD

NOD	<i>nucleotide oligomerization domain</i>
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ; réaction de polymérisation en chaîne
PMN	polymorphonucléaire neutrophile
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
qRT-PCR	<i>quantitative RT-PCR</i> , RT-PCR quantitative
PCR-RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i>
RFE	<i>reconstructed feline epidermis</i> ; épiderme félin reconstruit
ROR γ t	<i>retinoid-related orphan receptor gamma</i>
RPMI	<i>roswell park memorial institute</i> ; milieu standard utilisé en culture cellulaire
RT	<i>reverse transcription</i> , réverse transcription
SAB	milieu de Sabouraud
SD4	<i>syndecan-4</i>
SNI	surnageant non induit
<i>SUB</i>	gène d'une subtilisine
Sub	subtilisine
SVF	sérum de veau foetal
T-bet	<i>T box expressed in T cells</i>
TBK	<i>tank-binding kinase</i>
TCR	<i>T-cell receptor</i> , récepteur des cellules T
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Th	<i>T helper</i> ; T auxiliaire
TIR	<i>toll IL-1 receptor</i>
TIRAP	<i>TIR domain-containing adaptor protein</i>
TLR	<i>toll-like receptor</i> ; récepteur de type Toll
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAF	<i>TNF receptor-associated factor</i>
TRAM	<i>TRIF-related adaptor molecule</i>
Treg	<i>regulatory T</i> , T régulateur
TRIF	<i>TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β</i>
TRM	<i>Trichophyton rubrum mannans</i>
UFC	unités formant colonie
UV	ultraviolet
YEN	<i>yeast extract nitrogen</i>

Table des matières

Résumé	1
Abstract	3
Chapitre 1 : Introduction	5
1. Les dermatophytes et les dermatophytoses	6
1.1. Nomenclature et classification	6
1.2. Cycle de vie	10
1.3. Aspects cliniques	12
1.4. Diagnostic	15
1.5. Traitement	18
1.6. Composants structuraux et sécrétés des dermatophytes	18
2. Immunité antifongique	22
2.1. Généralités sur la réponse immune	22
2.2. Défenses cutanées	22
2.3. Reconnaissance fongique par le système immunitaire inné	25
2.4. Réponse immune cellulaire	30
2.5. Réponse en anticorps	33
2.6. Rôle des cellules immunitaires	34
3. La vaccination contre les dermatophytes	39
3.1. Les vaccins commerciaux	39
3.2. Les vaccins expérimentaux	41
4. Les modèles expérimentaux de dermatophytose	43
Chapitre 2 : Objectifs	45
Chapitre 3 : Présentation synoptique des résultats	48
Chapitre 4 : Section expérimentale	51
1. Etude 1	
Rôle des polymorphonucléaires félines dans la mise en place de la réponse immune au cours d'une dermatophytose à <i>Microsporum canis</i>	52
<i>1.1 Feline polymorphonuclear neutrophils produce pro-inflammatory cytokines following exposure to Microsporum canis</i>	54

1.2 Identification des PRR des PMN félins impliqués dans la reconnaissance des PAMP de <i>M. canis</i>	68
2. Etude 2	83
Evaluation des propriétés protectrices d'un constituant sécrété de <i>Microsporium canis</i> couplé à l'adjuvant monophosphoryl lipid A dans un essai vaccinal utilisant le cobaye comme modèle expérimental	85
<i>Assessment of immunogenicity and protective efficacy of a Microsporium canis secreted component coupled to monophosphoryl lipid A adjuvant in a vaccine trial using guinea pigs</i>	
3. Etude 3	104
Evaluation de la réponse immune cutanée au cours d'une dermatophytose à <i>Arthroderma benhamiae</i> et <i>Arthroderma vanbreuseghemii</i> en utilisant un modèle murin expérimental	106
<i>Assessment of the cutaneous immune response during Arthroderma benhamiae and Arthroderma vanbreuseghemii infection using an experimental mouse model</i>	
 Chapitre 5 : Discussion générale et perspectives	 126
 Chapitre 6 : Bibliographie	 138

Résumé

Les dermatophytoses (ou « teignes ») sont des mycoses cutanées superficielles provoquées par des champignons filamenteux, appelés dermatophytes, affectant les animaux et l'homme. *Microsporum canis* est un dermatophyte zoophile dont l'hôte naturel est le chat. Il touche principalement les carnivores domestiques et est un agent fréquent de zoonose. Les dermatophytes envahissant les structures kératinisées de l'épiderme, de nombreuses études ont porté sur la caractérisation des protéases sécrétées comme facteurs de virulence potentiels. Cependant, peu de recherches ont été consacrées aux mécanismes impliqués dans la mise en place de la réponse immune anti-dermatophytes. Il est couramment admis que la réponse immune protectrice lors d'une dermatophytose est une réponse à médiation cellulaire impliquant les lymphocytes de type Th1 et caractérisée par une réaction cutanée d'hypersensibilité de type retardé (*Delayed Type Hypersensitivity*, DTH). Un constituant sécrété de *M. canis* correspondant au surnageant de culture du champignon cultivé sur milieu de Sabouraud liquide, appelé surnageant non induit (SNI), provoque des DTH chez le cobaye immunisé après une primo-infection, ce qui suggère que le SNI contient des antigènes potentiellement intéressants pour le développement d'un vaccin. Le cobaye est le modèle animal le plus utilisé pour étudier l'immunologie des dermatophytoses. Cependant, la quasi absence d'outils génétiques et immunologiques dans cette espèce ne permet pas d'étudier la réponse immune induite lors de dermatophytoses de manière satisfaisante. La mise au point d'un modèle murin de dermatophytose permettrait de pallier tous ces inconvénients.

Au cours d'une dermatophytose à *M. canis*, les premières cellules rencontrées par le champignon lors de l'infection sont les kératinocytes qui, suite à l'activation par des composants fongiques, peuvent attirer les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) sur le site d'infection. Ces leucocytes sont, avec les macrophages, responsables *in fine* de l'élimination du dermatophyte. Cependant, le rôle des PMN dans les mécanismes liés à l'établissement de l'immunité anti-dermatophytes demeure inconnu.

L'objectif général de ce travail était de contribuer à l'étude de la réponse immune au cours d'une dermatophytose à *M. canis* et de mettre au point un nouveau modèle animal de dermatophytose. Pour l'atteindre, trois études ont été réalisées : (1) l'évaluation du rôle des PMN félins dans la mise en place d'une réponse immune protectrice au cours d'une dermatophytose à *M. canis*, (2) l'évaluation des propriétés protectrices du SNI de *M. canis* dans un essai vaccinal en utilisant le cobaye comme modèle expérimental et (3) la mise au point d'un modèle murin de dermatophytose pour l'étude de l'immunité anti-dermatophytes.

Les résultats obtenus dans la première étude montrent que les PMN félins produisent des cytokines pro-inflammatoires telles le *tumor necrosis factor* (TNF)- α , l'*interleukin* (IL)-1 β et l'IL-8 lorsqu'ils sont stimulés par les arthrospores vivantes du champignon ainsi que par des constituants structuraux, représentés par des arthrospores tuées par la chaleur, et sécrétés comme le SNI. De plus, après stimulation pendant 2 ou 4 heures par les arthrospores vivantes et tuées ainsi que par les protéases sécrétées Sub3 et Sub6, disponibles sous forme recombinante dans notre laboratoire, les taux d'ARNm du *toll like receptor* (TLR)-2 et du TLR-4 étaient augmentés dans les PMN. Ces résultats suggèrent que les PMN félins jouent un rôle dans l'établissement de la réponse immunitaire anti-*M. canis* en produisant des cytokines pro-inflammatoires et que les mécanismes responsables de cette activation feraient intervenir les récepteurs TLR-2 et TLR-4.

Dans la deuxième étude, les résultats indiquent que l'adjuvant monophosphoryl lipid-A (MPLA), dérivé non toxique du lipopolysaccharide et agoniste du TLR-4 a, à lui seul, un effet protecteur partiel chez les cobayes soumis à une épreuve d'infection par *M. canis*. En effet, les symptômes cutanés observés chez les cobayes ayant préalablement reçu l'adjuvant, étaient moins importants que ceux développés par les cobayes infectés n'ayant pas reçu l'adjuvant. En revanche, le SNI ne semble pas protéger les cobayes d'une infection expérimentale dans cet essai vaccinal.

Les résultats obtenus dans la troisième étude démontrent que notre modèle murin de dermatophytose est valide et reproductible, en utilisant *Arthroderma benhamiae* et *Arthroderma vanbreuseghemii*. Ce n'est pas le cas avec *M. canis*. En effet, 100 % et 80 % des souris infectées respectivement par *A. vanbreuseghemii* et *A. benhamiae* ont développé des symptômes cutanés typiques de dermatophytose, à savoir de l'érythème, des squames, des croûtes et de l'alopecie alors que seulement 40 % des souris infectées par *M. canis* ont développé des signes cliniques, par ailleurs très discrets. Le recrutement important de PMN dans la peau des souris infectées par *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii* et le profil cytokinique (*transforming growth factor* (TGF)- β , l'IL-1 β , l'IL-6 et l'IL-22) généré par l'infection suggèrent l'implication de la voie Th17 dans la mise en place de la réponse immunitaire anti-dermatophytes.

En conclusion, l'ensemble de ce travail a contribué à élargir nos connaissances sur la réponse immunitaire au cours d'une dermatophytose à *M. canis*. De plus, un nouveau modèle murin de dermatophytose à *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii* a été mis au point et est approprié pour l'étude de la réponse immunitaire anti-dermatophytes.

Abstract

Dermatophytoses (or ringworm) are superficial cutaneous mycoses caused by filamentous fungi called dermatophytes affecting both animals and humans. *Microsporum canis* is a zoophilic dermatophyte whose natural host is the cat. It primarily affects domestic carnivores and is responsible for a frequent zoonosis. As the epidermal keratinized structures are invaded by the dermatophytes, many studies focused on the characterization of secreted proteases as potential virulence factors. The study of the mechanisms involved in the set-up of the immune response against dermatophytes has been neglected. It is thought that the protective immune response during dermatophytosis is a cell type mediated immunity involving Th1 lymphocytes and characterized by a delayed type hypersensitivity (DTH) reaction. A secreted component (SC) from *M. canis*, corresponding to the culture supernatant obtained in liquid Sabouraud's medium, induces DTH in guinea pigs having spontaneously recovered from an experimental infection. Therefore, this SC may contain appropriate antigens for the development of an efficient vaccine. The most common animal model for studying the immune response during dermatophytoses is the guinea pig but the lack of genetic and immunologic tools available in this species is a barrier to further investigating complex mechanisms of immunity. Consequently, the establishment of a dermatophytosis mouse model is highly required.

During *M. canis* dermatophytosis, the first cells encountered by the fungus during infection are keratinocytes. Upon activation by fungal components, these cells are able to attract polymorphonuclear neutrophils (PMNs) on the site of infection. These leukocytes, along with macrophages, are known to be responsible for the elimination of dermatophytes. However, the precise role of PMNs in the set-up of the immunity against dermatophytes remains unknown.

The general objective of this work was to increase our knowledge about the immune response against *M. canis* infection and to develop a new animal model of dermatophytosis. To this purpose, three studies were designed: (1) assessing the role of feline PMNs in the set-up of a protective immune response during *M. canis* infection, (2) assessing protective efficacy of SC from *M. canis* in a vaccine trial using guinea pigs and (3) elaborate a mouse model of dermatophytosis allowing the study of the immunity against dermatophytes.

The results from the first study show that feline PMNs produce pro-inflammatory cytokines such as tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , and IL-8 upon exposure to *M. canis* live arthroconidia together with structural components, corresponding to heat-killed arthroconidia, and SC. Additionally, after stimulation for 2 or 4 hours with live or heat-

killed arthroconidia, secreted proteases Sub3 and Sub6, available in recombinant form in our laboratory, the levels of toll like receptor (TLR)-2 and TLR-4 mRNA were increased in PMNs. This suggests that feline PMNs are involved in the establishment of immunity against *M. canis* by producing pro-inflammatory cytokines and TLR-2 and TLR-4 receptors could be responsible for this activation.

In the second study, the monophosphoryl lipid-A (MPLA) adjuvant, a detoxified form of lipopolysaccharide and a TLR-4 agonist *per se* was shown to confer a partial protection in *M. canis* experimentally infected guinea pigs. Indeed, when pre-treated with the adjuvant, the guinea pigs developed less severe cutaneous symptoms than those not pre-treated. In contrast, the SC did not seem to protect guinea pigs from an experimental infection in this vaccine trial.

The results obtained in the third study demonstrate that our mouse model of dermatophytosis is valid and reproducible using *Arthroderma benhamiae* and *Arthroderma vanbreuseghemii*, as infecting agents in contrast with *M. canis*. Indeed, 100% and 80% of mice infected with *A. vanbreuseghemii* and *A. benhamiae* respectively, developed typical skin lesions of dermatophytosis, i.e. erythema, squamosis, crusts and alopecia. In *M. canis* infected mice, only 40% developed weak clinical lesions consistent with dermatophytosis. The considerable inflow of PMNs in the skin of mice infected with *A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii*, and the cytokine profile (transforming growth factor (TGF)- β , IL-1 β , IL-6 and IL-22) induced by infection suggest the involvement of the Th17 pathway in the set-up of immunity against dermatophytes.

In conclusion, this work has contributed in furthering our understanding of immunity during *M. canis* dermatophytosis. Furthermore, a new mouse model of dermatophytosis using *A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* was developed and is suitable for the study of the immune response against dermatophytes.

CHAPITRE 1

Introduction

1. Les dermatophytes et les dermatophytoses

1.1. Nomenclature et classification

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux kératinophiles et kératinolytiques capables d'envahir les structures épidermiques kératinisées (*stratum corneum*, poils et ongles ou griffes) et causant chez leurs hôtes des infections cutanées superficielles appelées dermatophytoses ou « teignes » (Weitzman et Summerbell, 1995 ; Chermette *et al.*, 2008). Cependant, dans de très rares cas, les dermatophytoses peuvent être sous-cutanées, en particulier chez des individus immunodéprimés. Les dermatophytes sont répartis en trois groupes classés en fonction de leur niche écologique : les dermatophytes géophiles, zoophiles et anthropophiles (Weitzman et Summerbell, 1995). Les dermatophytes géophiles vivent et se développent dans le milieu extérieur, principalement sur des débris kératinisés en décomposition. Ils n'infectent l'homme et les animaux que de façon accidentelle. Les dermatophytes zoophiles sont inféodés à une ou plusieurs espèces animales. Contrairement aux dermatophytes géophiles, ils réalisent l'entièreté de leur cycle de vie sur un hôte, même s'ils peuvent survivre dans le milieu extérieur à l'état de spores. Les dermatophytes anthropophiles sont similaires aux dermatophytes zoophiles excepté qu'ils sont inféodés à l'homme. La plupart des dermatophytes zoophiles sont des agents de zoonose (Mignon et Monod, 2011).

Sur base des caractéristiques de leur forme sexuée (ou téléomorphe), les dermatophytes sont classés dans l'embranchement des ascomycètes (Ascomycota). La reproduction sexuée des dermatophytes est difficile à obtenir et n'est observable que sous des conditions de culture bien particulières. Les dermatophytes sont le plus souvent hétérothalles : pour obtenir une reproduction sexuée, il faut confronter deux mycéliums ayant des polarités différentes, l'un de signe (*mating type*) (+), l'autre de signe (-). Le milieu utilisé pour stimuler la reproduction sexuée des dermatophytes est un milieu à base de graines de Niger (*Guizotia abyssinica*) (De Vroey, 1964). Sur base des caractéristiques de leur forme asexuée (ou anamorphe), la seule rencontrée en clinique, les dermatophytes sont répartis en trois genres : *Epidermophyton*, *Microsporum* et *Trichophyton* (Tableau 1). *In vivo*, les dermatophytes forment des filaments mycéliens septés d'environ 2 à 4 µm de diamètre qui se fragmentent en spores infectantes appelées arthrospores ou arthroconidies. En culture (*in vitro*), ils produisent des microconidies et des macroconidies dont la morphologie et la disposition constituent un important critère d'identification des espèces (Van Cutsem et Rochette, 1992). Le genre *Microsporum* regroupe des espèces produisant des macroconidies à

paroi échinulée tandis que les espèces appartenant au genre *Trichophyton* produisent des macroconidies à paroi lisse. Une seule espèce appartenant au genre *Epidermophyton* a été identifiée, il s'agit d'*E. floccosum*.

Tableau 1. Classification des dermatophytes selon leur habitat naturel. D'après Mignon et Monod (2011).

Géophiles	Zoophiles (hôte préférentiel)	Anthropophiles
Complexe <i>M. gypseum</i> / <i>M. fulvum</i>	<i>M. canis</i> (chat)	<i>M. andouinii</i>
<i>T. terrestre</i>	<i>M. equinum</i> (cheval)	<i>M. ferrugineum</i>
<i>T. ajelloi</i>	<i>M. persicolor</i> (rongeurs)	<i>T. interdigitale</i>
<i>M. cookei</i>	<i>M. nanum</i> (porc)	<i>T. tonsurans</i>
	<i>A. benhamiae</i> (cobaye)	<i>T. rubrum</i>
	<i>T. erinacei</i> (hérisson)	<i>T. violaceum</i>
	<i>A. vanbreuseghemii</i> (chat, chien)	<i>T. soudanense</i>
	<i>T. equinum</i> (cheval)	<i>T. schoenleinii</i>
	<i>T. simii</i> (cochon)	<i>T. concentricum</i>
	<i>T. verrucosum</i> (vache, mouton)	<i>E. floccosum</i>
	<i>T. gallinae</i> (gallinacés)	
	<i>T. quinckeanum</i> (souris)	

A : *Arthroderma* ; E : *Epidermophyton* ; M : *Microsporum* ; T : *Trichophyton*

Une autre classification des espèces basée principalement sur des données moléculaires et notamment les séquences des régions ITS (*internal transcribed spacer*) est actuellement utilisée (Graser *et al.*, 2008). Cette classification ne tient pas compte des différences de morphologie, de physiologie et d'écologie des dermatophytes ainsi que des signes cliniques associés. C'est ainsi que, sur base de leurs séquences ITS, certaines espèces du genre *Trichophyton*, difficilement différenciables macroscopiquement, ont pu être identifiées. Ainsi, les espèces *Arthroderma benhamiae* et *Arthroderma vanbreuseghemii* ont été identifiées à partir du complexe *Trichophyton mentagrophytes* (Drouot *et al.*, 2009). Cependant, certaines espèces distinctes comme *Trichophyton equinum* et *Trichophyton tonsurans* ont été décrites comme identiques sur base de leurs séquences ITS. La première étude combinant l'identification moléculaire (basée sur les séquences ITS et sur l'ADN ribosomal 28S) avec la reproduction sexuée a été réalisée récemment (Symoens *et al.*, 2011). La distinction précise d'*A. benhamiae* et d'*A. vanbreuseghemii* a ainsi pu être établie à partir du complexe *T. mentagrophytes*.

Les espèces de dermatophytes étudiées dans le cadre de cette thèse sont *Microsporum canis*, *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii*. Toutes trois sont des espèces zoophiles et zoonotiques. Si *M. canis* est facilement identifiable par l'aspect macroscopique et microscopique de ses colonies, il n'en est pas de même pour *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii* dont la différenciation impose le recours aux techniques moléculaires (Figures 1, 2, 3, 4). *Microsporum canis*, dont la forme sexuée est *A. otae*, produit préférentiellement des macroconidies tandis qu'*A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii* forment plus abondamment des microconidies. *Microsporum canis* a pour hôte naturel le chat (Pier et Moriello, 1998) mais peut infecter d'autres espèces animales telles le chien et le cobaye (Chermette *et al.*, 2008 ; Kraemer *et al.*, 2012). *Arthroderma benhamiae* et *A. vanbreuseghemii* représentent des formes sexuées du complexe *T. mentagrophytes* identifiées par croisement de souches isolées respectivement de rongeurs (Ajello et Cheng, 1967) et de l'homme, la souris et le chinchilla (Takashio, 1973). *Arthroderma benhamiae* infecte principalement le cobaye (Fumeaux *et al.*, 2004 ; Drouot *et al.*, 2009) tandis qu'*A. vanbreuseghemii* est plus fréquemment retrouvé chez le chat et le chien et plus rarement chez les rongeurs (Drouot *et al.*, 2009 ; Mignon et Monod, 2011).

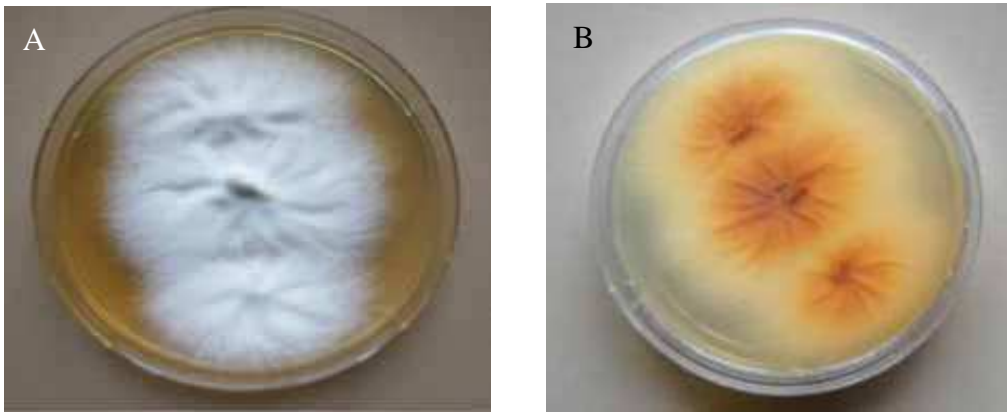


Figure 1. Aspect macroscopique de *Microsporium canis* (souche IHEM 21239) cultivé sur milieu de Sabouraud. Le recto des colonies apparaît blanc-jaune (A) et le verso est de couleur jaune orangé (B).

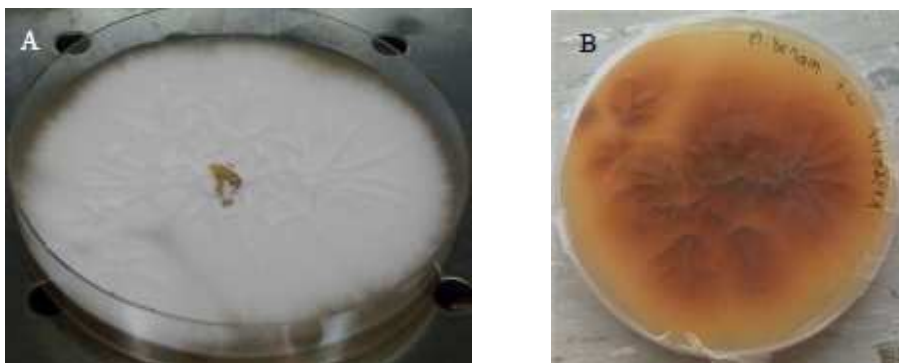


Figure 2. Aspect macroscopique d'*Arthroderma benhamiae* (souche IHEM 20163) cultivé sur milieu de Sabouraud. Les colonies fongiques sont de couleur blanche au recto (A) et sont de couleur beige-brun au verso (B).

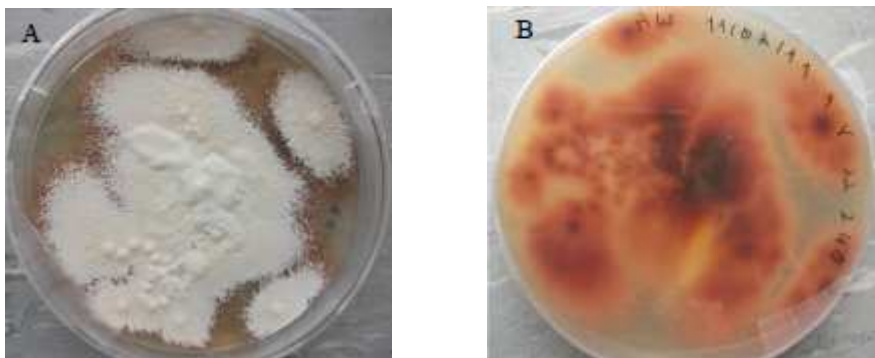


Figure 3. Aspect macroscopique d'*Arthroderma vanbreuseghemii* (souche IHEM 22740) cultivé sur milieu de Sabouraud. Le recto des colonies est de couleur blanc crème à pêche (A) tandis que le verso est brun (B).

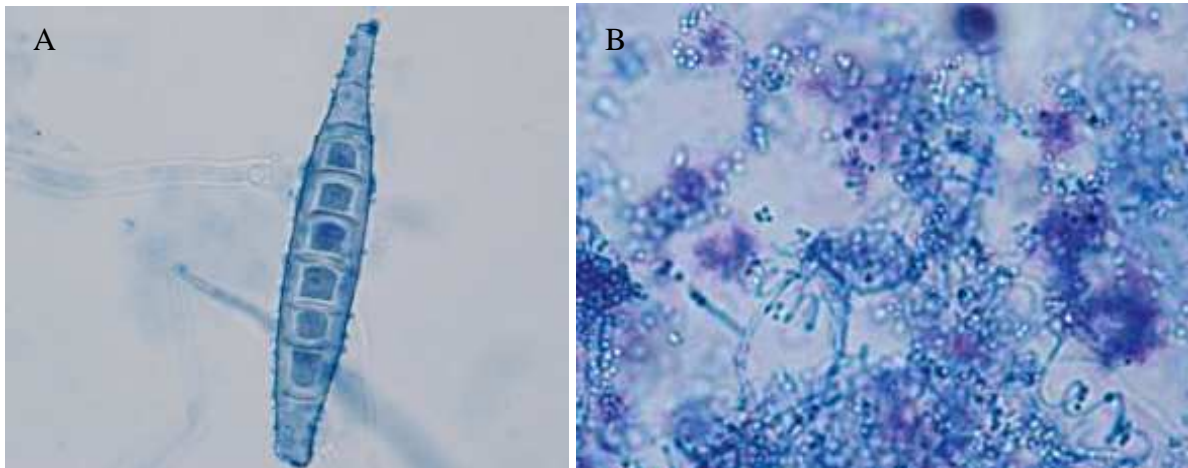


Figure 4. Aspect microscopique de *Microsporium canis* (A) et *Arthroderma vanbreuseghemii* (B) en culture. Les macroconidies formées par *M. canis* (A) sont nombreuses et typiques, fuselées et divisées en 4 à 8 logettes. *Arthroderma vanbreuseghemii*, comme *Arthroderma benhamiae*, forment de nombreuses microconidies rondes et disposées en grappe ; des filaments mycéliens en forme de spires sont typiques (B).

1.2. Cycle de vie

Les dermatophytes anthropophiles et zoophiles ont tous un cycle de vie similaire et ne peuvent pas se reproduire de façon saprophyte dans leur milieu naturel. La transmission se fait via des arthrospores qui représentent les éléments infectieux et dont la survie dans l'environnement peut atteindre jusqu'à deux ans (Sparkes *et al.*, 1994).

La première étape dans la genèse d'une dermatophytose est caractérisée par l'adhérence des arthrospores au pelage ou à l'épiderme (Weitzman et Summerbell, 1995). Cette phase est primordiale pour la réussite de l'infection et a lieu très rapidement après contact avec l'hôte. L'adhérence aux kératinocytes humains a lieu dès 4 h pour *Trichophyton rubrum* et *T. mentagrophytes* (Zurita et Hay, 1987). Sur un modèle d'épiderme félin reconstruit (*reconstructed feline epidermis*, RFE) mis au point dans notre laboratoire (Tabart *et al.*, 2007 ; Tabart *et al.*, 2008), il a été démontré que l'adhérence de *M. canis* débute 2 h après l'infection et continue d'augmenter après 6 h (Baldo *et al.*, 2008).

L'adhérence des champignons aux tissus de l'hôte représente une étape cruciale dans l'établissement d'une infection. Elle permet de résister aux forces physiques qui peuvent les éliminer et elle précède l'invasion tissulaire. Le principal mécanisme d'adhérence des champignons repose sur la reconnaissance spécifique entre des adhésines fongiques et des récepteurs de l'hôte. Les adhésines identifiées chez les champignons pathogènes sont principalement des protéines et des mannoprotéines. La classification des adhésines repose

sur la nature des ligands auxquels elles se lient. Les adhésines de type lectine permettent aux microconidies de *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* d'adhérer aux cellules épithéliales en se liant à des résidus mannose et galactose (Esquenazi *et al.*, 2003 ; Esquenazi *et al.*, 2004). Des adhésines fibrillaires ont été observées au niveau de la surface des microconidies et des arthrospores de *T. mentagrophytes* durant la phase d'adhérence aux cornéocytes (Aljabre *et al.*, 1993 ; Kaufman *et al.*, 2007). Un autre mécanisme d'adhérence des champignons fait intervenir les protéases. Récemment, il a été démontré que les protéases sécrétées par les dermatophytes, et plus particulièrement les endoprotéases de type subtilisine (Sub), sont impliquées dans cette première étape du processus infectieux (Monod, 2008). Parmi elles, la protéase Sub3 de *M. canis* est nécessaire pour permettre l'adhérence du champignon à l'épiderme du chat (Baldo *et al.*, 2008 ; Baldo *et al.*, 2010) et d'autres espèces animales ainsi qu'à l'homme (Bagut *et al.*, 2012). Les endoprotéases de type subtilisine ne sont certainement pas les seules protéases impliquées dans l'adhérence des dermatophytes aux structures kératinisées. Chez *M. canis*, il a été démontré à l'aide d'un modèle *ex vivo* de dermatophytose utilisant des explants cutanés félines, que les gènes de deux dipeptidyl peptidases, *DPPIV* et *DPPV* qui ont été isolés dans notre laboratoire (Vermout *et al.*, 2008a), sont transcrits dans les arthrospores 4 h après l'étape d'infection (Mathy *et al.*, 2010). Les protéases DppIV et DppV pourraient donc intervenir dans l'étape d'adhérence de *M. canis* à l'épiderme félin.

La phase d'adhérence est rapidement suivie par la phase de germination. Lorsque le contact est établi, les arthrospores germent et les filaments mycéliens pénètrent dans le *stratum corneum*. La germination des arthrospores doit s'effectuer rapidement pour éviter l'élimination du champignon par la desquamation constante de l'épiderme (Richardson, 1990).

La troisième et dernière phase de l'infection est la phase d'invasion. Les filaments mycéliens croissent dans le *stratum corneum* à la fois verticalement et horizontalement puis, lorsqu'ils rencontrent l'orifice du follicule pileux, pénètrent dans la gaine épithéliale externe kératinisée du follicule jusqu'à l'infundibulum, puis dans la gaine épithéliale interne et enfin dans le poil. Le poil est progressivement envahi par les hyphes (à l'intérieur du poil) et les arthrospores (à l'extérieur du poil pour *M. canis*) (Figure 5). Le poil, ainsi fragilisé, se casse à quelques millimètres au-dessus de la surface cutanée et des spores sont alors éliminées sur la peau et dans l'environnement. Le dermatophyte peut ensuite infecter d'autres follicules pileux, ce qui explique l'évolution centrifuge des lésions.

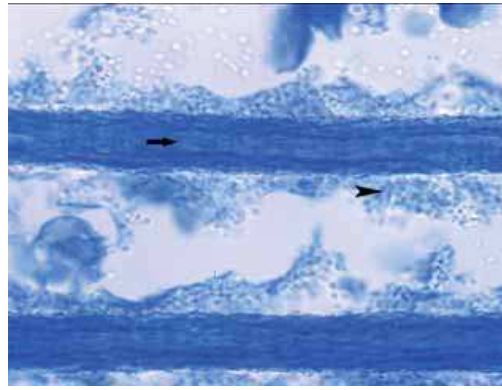


Figure 5. Examen microscopique de poils de chat atteint de dermatophytose à *Microsporum canis* dans du bleu de lactophénol. Des filaments intrapilaires (flèche) et des arthrospores à l'extérieur du poil (tête de flèche) sont visibles.

1.3. Aspects cliniques

Les lésions de dermatophytose chez l'homme et l'animal sont très polymorphes et résultent de la dégradation de la kératine et de la réponse inflammatoire de l'hôte (Degreef, 2008). Les lésions classiques de teigne rencontrées chez les animaux domestiques sont des dépilations circulaires, érythémateuses, squameuses et, le plus souvent, peu ou pas prurigineuses. Elles sont généralement localisées au niveau de la tête et des extrémités des membres (Van Cutsem et Rochette, 1992). La symptomatologie dépend notamment du degré d'adaptation du dermatophyte à son espèce hôte. Ainsi, les dermatophytes zoophiles provoquent chez l'homme des lésions souvent très inflammatoires mais qui guérissent relativement rapidement. En revanche, l'infection d'un hôte naturel induit des lésions souvent peu inflammatoires et peut évoluer de façon chronique (Muller *et al.*, 1989).

Microsporum canis est responsable de plus de 95 % des teignes félines. Les lésions induites chez le chat infecté sont en général discrètes et peuvent guérir spontanément (Figure 6). Cependant, la réponse à l'infection peut être faible voire absente avec, dans certains cas, l'établissement du champignon à l'état chronique et l'apparition de nombreux chats infectés asymptomatiques. Les animaux qualifiés de « porteurs asymptomatiques » peuvent être de simples porteurs mécaniques transitoires ou être réellement infectés. Chez ces derniers, le dermatophyte envahit la peau et s'y multiplie, presque à la manière d'un champignon commensal (Mignon et Losson, 1997 ; Mignon *et al.*, 2008). Il en résulte une dissémination constante et importante d'éléments fongiques dans l'environnement y compris sur les animaux et les hommes qui vivent au contact de l'animal. *Microsporum canis* est aussi

transmissible à d'autres espèces animales mais est également responsable d'une zoonose dont l'incidence est en augmentation (Lateur, 2000 ; Seebacher *et al.*, 2008 ; Mignon et Monod, 2011). Etant peu adapté à l'homme, *M. canis* peut causer chez celui-ci des lésions beaucoup plus inflammatoires que celles observées chez le chat (Figure 6).

Arthroderma benhamiae, dont l'hôte naturel est le cobaye (Fumeaux *et al.*, 2004 ; Drouot *et al.*, 2009), induit chez celui-ci des lésions de dermatophytose caractérisées par de l'alopecie et du squamosis (Figure 7A, B). Il est également un agent de zoonose produisant chez l'homme des lésions fortement inflammatoires du cuir chevelu (*tinea capitis*) et de la peau glabre (*tinea corporis*) (Figure 7C). *Arthroderma vanbreuseghemii* infecte plus fréquemment le chien et le chat et est également un agent de zoonose (Figure 8).

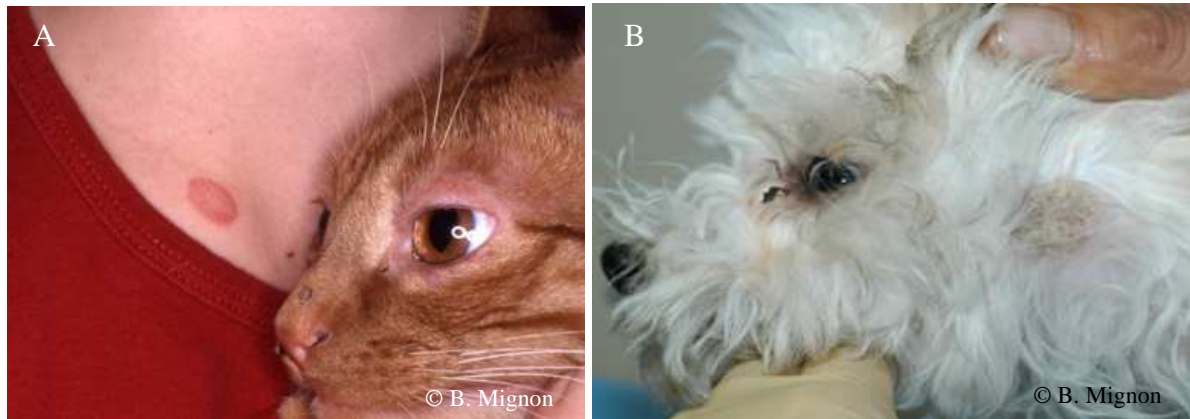


Figure 6. Dermatomycose à *Microsporium canis*.

A : Chat atteint de blépharite et épidermophytie circinée chez sa propriétaire.

B : Lésion sur le cou d'un chien caractérisée par une dépilation focale squameuse.

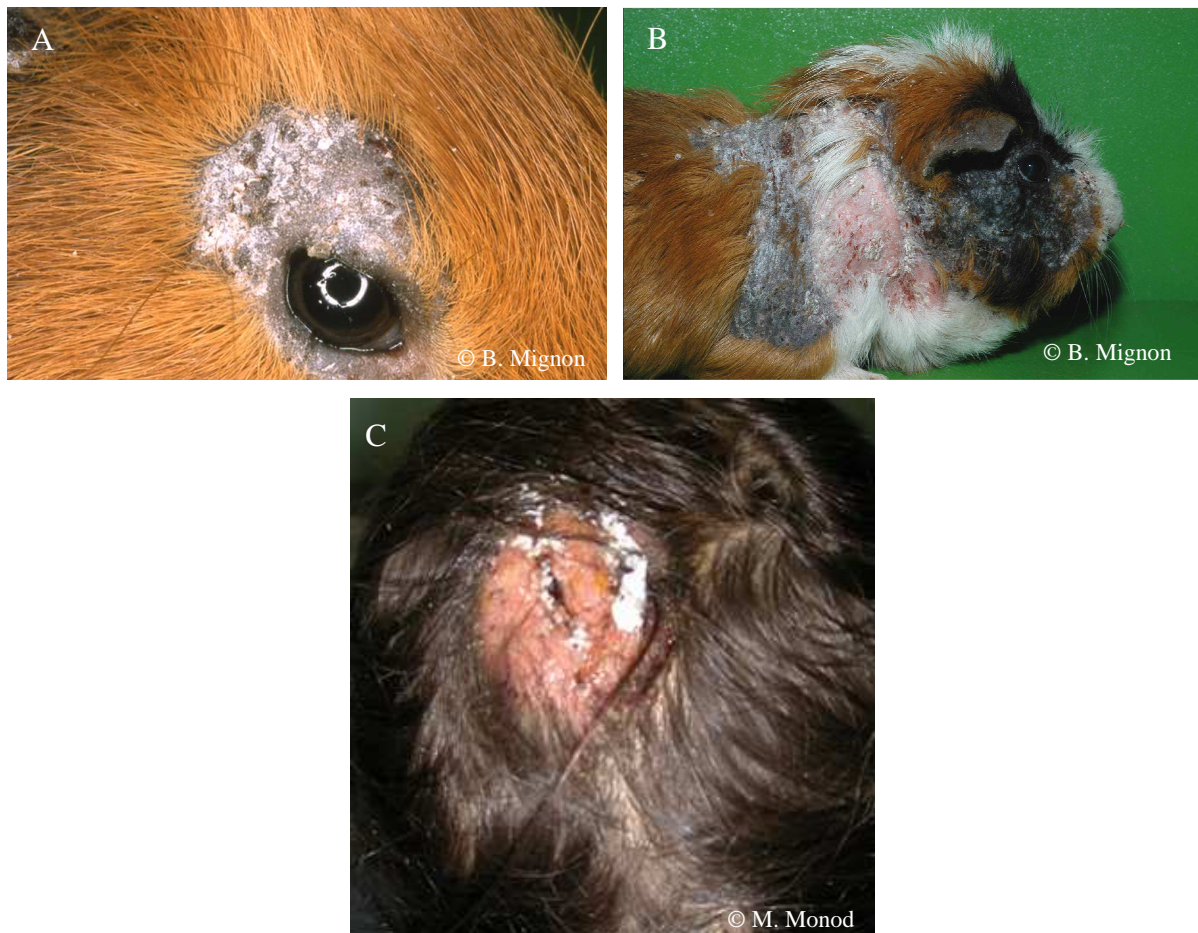


Figure 7. Dermatomycose à *Arthroderma benhamiae*.

A-B : Lésions inflammatoires caractérisées par de l'alopecie et du squamosis chez un cobaye.

C : Lésions inflammatoires du cuir chevelu chez un enfant (*tinea capitis*).

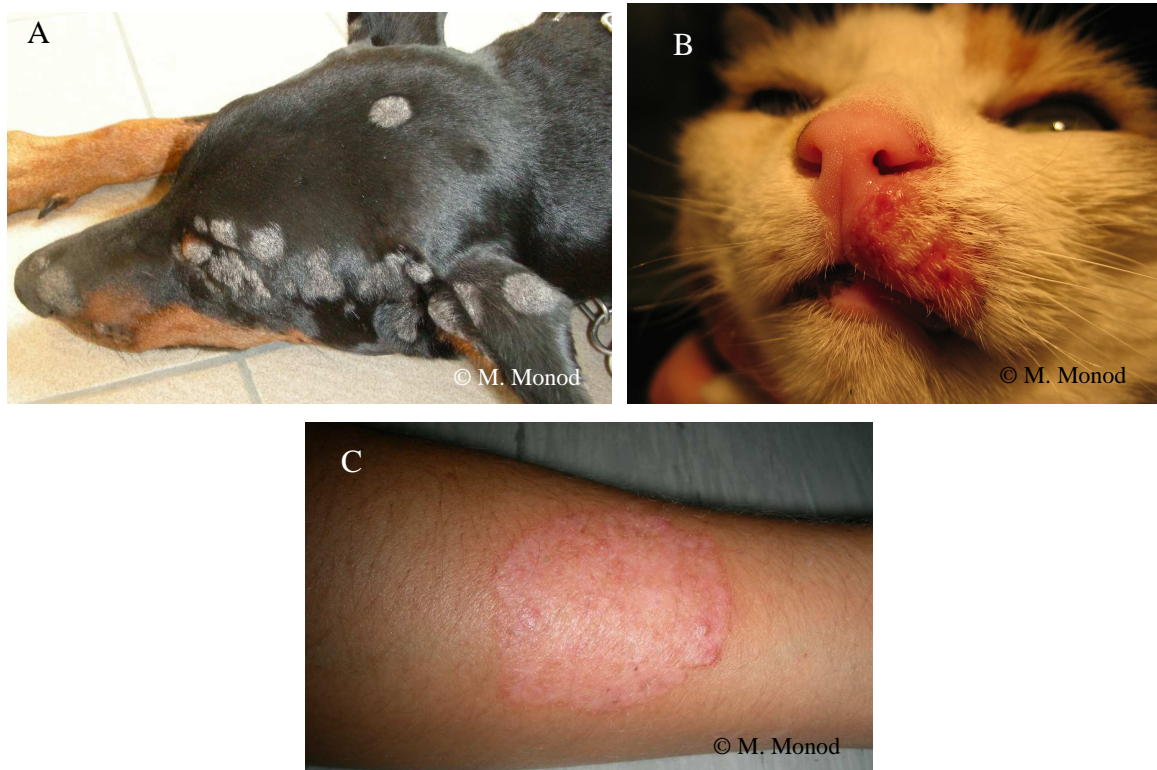


Figure 8. Dermatophytose à *Arthroderma vanbreuseghemii*.
 A : Alopécie multifocale et circulaire chez un chien.
 B : Chéilite chez un chat.
 C : Lésions inflammatoires de la peau glabre chez l'homme (*tinea corporis*)

1.4. Diagnostic

Lors de suspicion de teigne chez un animal, les examens complémentaires utilisés sont : l'examen à la lampe de Wood, l'examen microscopique direct, la culture fongique et l'examen histopathologique. Cependant, ces dernières années, la recherche a permis l'émergence de nombreuses techniques de diagnostic basées sur la biologie moléculaire. Celles-ci permettent un diagnostic plus rapide et plus spécifique.

La grande majorité des souches de *M. canis* provoque des lésions qui peuvent être visualisées à la lampe de Wood. Grâce à la lumière ultraviolette, d'une longueur d'onde de 365 nm, les poils infectés apparaissent fluorescents et verdâtres sous la lampe (Figure 9). Les ongles infectés sont rarement fluorescents sous la lampe de Wood ; de plus, certains traitements topiques peuvent faire disparaître la fluorescence (Chermette *et al.*, 2008). Si, en pratique clinique, l'examen à la lampe de Wood demeure un excellent examen d'orientation, le diagnostic doit être confirmé par l'examen microscopique direct et la culture fongique. En effet, les poils infectés sont généralement cassés et la fluorescence peut être particulièrement difficile à observer chez les chats à poils longs.

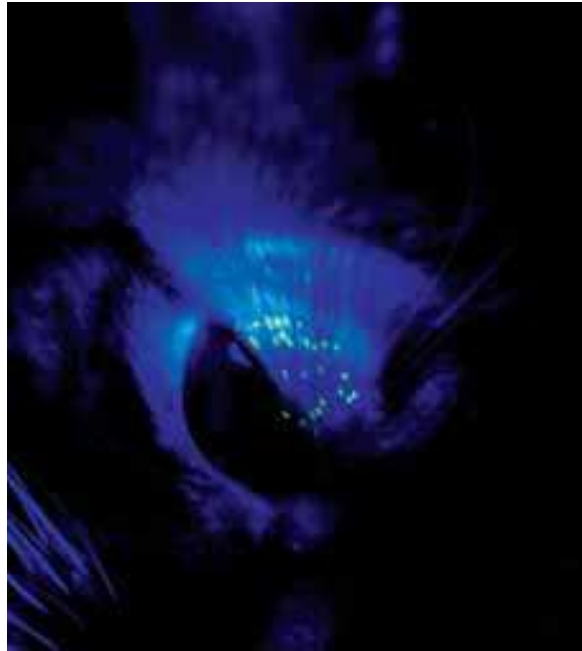


Figure 9. Chat atteint de dermatophytose à *Microsporium canis* : les poils envahis par le champignon sont fluorescents sous la lampe de Wood.

L'examen microscopique direct est réalisé sur des poils et des squames obtenus par raclage cutané ou épilation à partir de lésions ou sur des poils fluorescents à la lampe de Wood dans le cas d'une infection par *M. canis*. L'échantillon ainsi obtenu est examiné dans une solution de chloral lactophénol ou d'hydroxyde de potassium 10 %. La mise en évidence des éléments fongiques peut être facilitée en utilisant des fluorochromes, le calcofluor ou le blankophor (Monod *et al.*, 2000), mais cet examen requiert un microscope à fluorescence et n'est donc pratiqué qu'en laboratoire. A l'examen direct, au grossissement 40 ×, les poils infectés apparaissent souvent élargis et leurs contours sont irréguliers. Des amas d'arthrospores sont observés autour des poils et des filaments fongiques à l'intérieur des poils (Figure 5). L'examen microscopique direct permet donc d'établir rapidement un diagnostic de certitude, mais sa sensibilité dépend de la qualité du prélèvement et de l'expérience du vétérinaire.

La culture fongique est considérée comme l'examen de référence permettant un diagnostic définitif et l'identification précise du champignon. Le prélèvement destiné à la culture est identique à celui utilisé pour l'examen microscopique direct. Il est ensemencé sur

un milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques antibactériens et de cycloheximide qui inhibent la croissance des micro-organismes contaminants. Après environ 10 jours d'incubation à 27°C, le dermatophyte peut être identifié grâce aux caractéristiques micro- et macroscopiques des colonies. Un autre milieu, le milieu DTM (*dermatophyte test medium*) peut également être utilisé pour le diagnostic d'une dermatophytose (Guillot *et al.*, 2001). Ce milieu contient des nutriments permettant la croissance des dermatophytes, des antibiotiques spécifiques contre la plupart des contaminants bactériens et fongiques et un indicateur de pH, le rouge phénol. Les dermatophytes utilisent préférentiellement les composants protéiques du milieu pour leur croissance, ce qui rend le pH du milieu alcalin (le milieu DTM passe alors du jaune au rouge). Les champignons saprophytes, préférant les carbohydrates ne modifient pas le pH lors de leur croissance. Ce milieu permet donc de détecter la présence du dermatophyte 4 jours après l'ensemencement du prélèvement. Cependant, certains champignons non pathogènes génèrent des faux-positifs et des faux-négatifs peuvent également être obtenus en présence de bactéries ou avec certaines espèces comme *Microsporum persicolor* (Robert et Pihet, 2008).

L'examen histopathologique de biopsies cutanées est rarement indispensable pour poser un diagnostic de teigne, mais il peut toutefois s'avérer plus sensible que l'examen microscopique direct dans les cas où le dermatophyte est présent en très faible quantité. Les filaments mycéliens et les conidies sont visibles après coloration à l'hématoxyline-éosine, mais des colorations plus spécifiques facilitent leur mise en évidence, comme celle à l'acide periodique de Schiff (PAS) ou celle de Gomori-Grocott. Le PAS colore en rouge les éléments fongiques, tandis que la coloration de Gomori-Grocott colore en noir intense la paroi par imprégnation argentique.

Les techniques moléculaires qui ont permis de mieux comprendre l'épidémiologie des dermatophytoses constituent également une nouvelle approche dans le diagnostic des dermatophytoses (Kanbe, 2008 ; Hay et Jones, 2010 ; Mignon, 2010). Ainsi, des techniques basées sur l'amplification de l'ADN ribosomal 28S des dermatophytes par PCR (Monod *et al.*, 2006) ou par PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) (Bontems *et al.*, 2009) permettent de diagnostiquer les onychomycoses (mycoses des ongles) en un ou deux jours. D'autres techniques basées sur l'amplification de séquences ITS ont également été mises au point et permettent un diagnostic rapide avec, pour certaines, une identification précise de l'espèce endéans les 3-4 jours (Arabatzis *et al.*, 2007 ; Bergmans *et al.*, 2008). Des techniques similaires sont également utilisées pour déterminer l'agent étiologique lors de teigne chez les animaux (Kano *et al.*, 2003 ; Arabatzis *et al.*, 2006). Concernant

l'identification des dermatophytes, en alternative aux techniques de PCR, la spectrométrie de masse a commencé à se développer. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight*) permet une identification rapide et précise du dermatophyte. De plus, le faible coût de cette technique et sa simplicité d'utilisation ont permis son intégration en routine dans les laboratoires de diagnostic (Carbonnelle et Nassif, 2011).

1.5. Traitement

Bien que les dermatophytoses peuvent guérir spontanément en trois mois chez les animaux (DeBoer et Moriello, 1995a ; Scott *et al.*, 2001) comme chez l'homme, un traitement s'avère nécessaire dans la majorité des cas. Chez l'animal, il est recommandé d'associer au traitement antifongique local, un traitement systémique et la décontamination de l'environnement. Le traitement topique consiste en des balnéations, sans rinçage, sur l'entièreté de la surface corporelle. En Europe, l'énilconazole à 0,2 % est le produit topique le plus souvent recommandé. Les agents antifongiques systémiques les plus couramment utilisés sont l'itraconazole, le kétoconazole et la terbinafine.

Chez l'homme, l'utilisation de produits antifongiques par voie systémique est souvent nécessaire lorsque les lésions sont étendues, lors de dermatophytose chronique ou lorsque l'application d'un traitement topique s'est révélée inefficace (Gupta et Cooper, 2008). Pour les teignes du cuir chevelu, un traitement systémique est toujours nécessaire, de même que pour les onychomycoses en cas d'atteinte matricielle.

Les traitements utilisés dans les dermatophytoses sont longs, coûteux et peuvent avoir des effets toxiques, en particulier pour le foie. C'est pourquoi la mise au point d'un vaccin efficace, préventif et/ou thérapeutique, constituerait un des meilleurs moyens pour lutter contre les dermatophytes.

1.6. Composants structuraux et sécrétés des dermatophytes

Les composants structuraux correspondent notamment aux constituants de la paroi des dermatophytes. La paroi cellulaire des dermatophytes, comme celle de tous les champignons, est constituée de polysaccharides et de protéines dont près de la moitié sont des mannoprotéines. Les trois polysaccharides principaux sont le β -glucane, la chitine et les mannanes (polymères de mannose) (Netea *et al.*, 2008) (Figure 10). Le β 1,3-glucane forme

des liaisons covalentes avec le β 1,6-glucane et la chitine représente la composante structurelle de base du champignon. Les mannoprotéines se trouvent sur la partie la plus externe de la paroi et sont composées de polymères de mannose associés à des protéines par des liaisons covalentes de type O ou N. Les β -glucanes contenus dans la paroi cellulaire fongique diffèrent selon le type de champignon. La paroi d'*Aspergillus fumigatus* contient des β 1,3- et β 1,4-glucanes (Latge, 1999) tandis que celle de *Candida albicans* contient des β 1,3- et β 1,6-glucanes (Netea *et al.*, 2008). La paroi des dermatophytes qui contient de la chitine, des β -glucanes, des mannanes et des galactomannanes (Grappel *et al.*, 1969 ; Ikuta *et al.*, 1997) a été moins étudiée que celle d'autres champignons pathogènes. Toutefois, des études ont montré que les mannanes de *T. rubrum* sont capables d'inhiber *in vitro* la réponse lymphoproliférative chez l'homme (Green et Balish, 1979 ; Sherwin *et al.*, 1979 ; Blake *et al.*, 1991). Plus récemment, une protéine de surface d'*A. benhamiae*, l'hydrophobine HypA, a été identifiée comme étant le constituant majeur du « *surface rodlet layer* » (couche hydrophobe présente à la surface des microconidies) du dermatophyte et les auteurs ont démontré que cette protéine est impliquée dans la reconnaissance du champignon par les cellules du système immunitaire (Heddergott *et al.*, 2012).

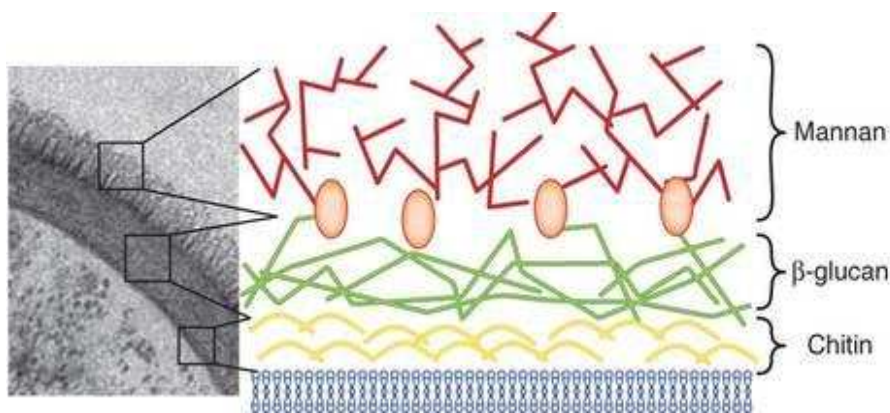


Figure 10. Représentation schématique d'une paroi fongique. D'après Hardison et Brown (2012).

En plus des constituants structuraux ayant un rôle important dans la pathogenèse de l'infection, les dermatophytes sécrètent de nombreux composants enzymatiques en comparaison à d'autres champignons pathogènes (Monod, 2008). Parmi eux, les protéases jouent un rôle important dans la dégradation des tissus kératinisés. Cependant, elles semblent incapables à elles seules de dégrader la kératine. En effet, la dégradation de la kératine par les

endoprotéases doit être accompagnée par la réduction des ponts disulfure entre résidus cystéine responsables de la résistance des tissus kératinisés (Lechenne *et al.*, 2007). Un schéma illustrant les étapes de la dégradation des tissus kératinisés par les dermatophytes à pH neutre est détaillé dans la figure 11. Durant la dégradation enzymatique, les dermatophytes sécrètent des sulfites, via l'enzyme Ssu1, appelée « pompe à sulfites », qui sont responsables de la réduction des ponts disulfure (Kunert, 1972). La perte de structure de la kératine rend les liaisons peptidiques plus accessibles aux endo- et exo- protéases. L'action coopérative des protéases et des agents réducteurs permet la formation de petits peptides et d'acides aminés qui pourront être captés par la cellule. La réduction des ponts disulfure entraîne la formation de taux élevés de cystéine qui sont toxiques pour la cellule mais qui peuvent être métabolisés en S-sulphocystéine via l'enzyme Cdo1 (cystéine dioxygénase). Récemment, il a été suggéré chez *A. benhamiae* que les enzymes Cdo1 et Ssu1 avaient un rôle majeur dans la virulence (Grumbt *et al.*, 2013). En effet, les souches mutantes pour les enzymes Cdo1 et Ssu1 présentaient une croissance particulièrement défectueuse par rapport aux souches sauvages sur des poils et des ongles isolés *in vitro*.

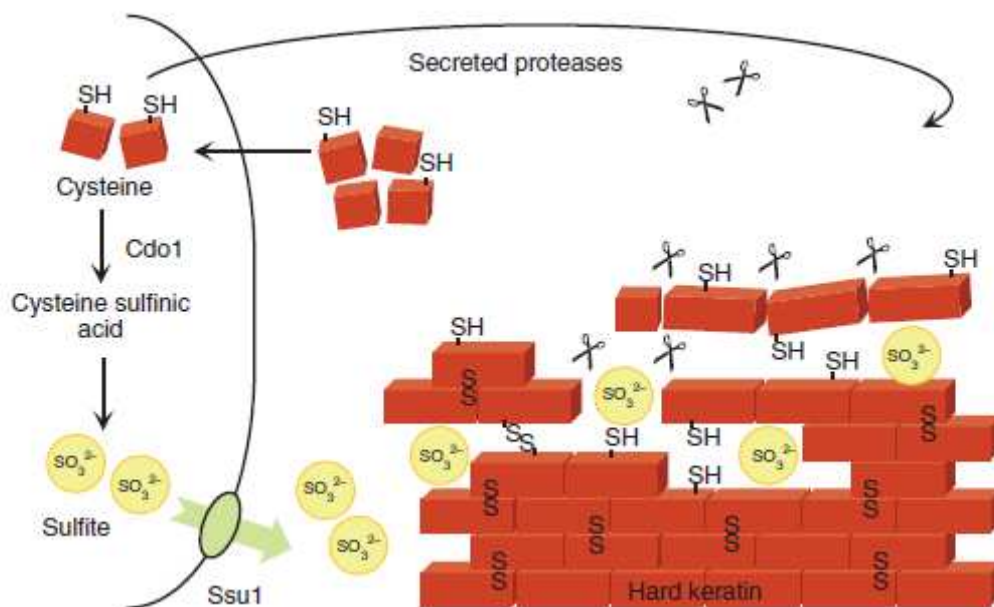


Figure 11. Modèle représentatif de la voie de dégradation des tissus kératinisés par les dermatophytes. D'après Grumbt *et al.*(2013).

Les protéases sécrétées des dermatophytes joueraient également un rôle important dans la virulence. Chez *M. canis*, deux familles de gènes codant pour des protéases sécrétées ont été identifiées : une famille de douze gènes codant pour des protéases à sérine de type subtilisine, dénommés *SUB1* à *SUB12* (Descamps *et al.*, 2002 ; White *et al.*, 2008) et une famille de cinq gènes codant pour des métalloprotéases dénommés *MEP1* à *MEP5* (Brouta *et al.*, 2002 ; Jousson *et al.*, 2004). A ces familles s'ajoutent les gènes codant pour les dipeptidyl-peptidases IV et V (Dpp IV et Dpp V) (Vermout *et al.*, 2008a). Les protéases codées par ces gènes ont été identifiées et certaines ont été caractérisées (Mignon *et al.*, 1998b ; Brouta *et al.*, 2001 ; Vermout *et al.*, 2008a). Les Mep et les Sub sont des endo-protéases tandis que les Dpp sont des exo-protéases libérant des dipeptides spécifiques à l'extrémité N-terminale des polypeptides. La métalloprotéase-3 de *M. canis* est kératinolytique, collagénolytique et élastinolytique (Brouta *et al.*, 2001), et a été produite sous forme recombinante dans notre laboratoire (Brouta *et al.*, 2002). La subtilisine-3, qui est également kératinolytique, est la protéase sécrétée de façon majoritaire dans des milieux contenant de la kératine comme unique source d'azote (Mignon *et al.*, 1998a) et a également été produite sous forme recombinante (Descamps *et al.*, 2003a). Son rôle dans l'adhérence a été décrit plus haut dans le paragraphe 1.2. Parmi ces protéases, deux (Mep3 et Sub3) ont été testées comme candidat vaccinal, en utilisant le cobaye comme modèle expérimental, mais sans succès (Descamps *et al.*, 2003b ; Vermout *et al.*, 2004). Plus récemment, la protéase Sub6 de *M. canis* a été caractérisée et produite sous forme recombinante (Mathy, 2012). Contrairement à Sub3, Sub6 est non kératinolytique et est surexprimée *in vivo*. De plus, elle induit des réactions cutanées d'hypersensibilité de type retardé (*delayed type hypersensitivity*, DTH) chez le cobaye guéri d'une infection expérimentale (Mathy, 2012). Ces DTH sont associées à une réponse immune à médiation cellulaire qui serait protectrice dans les dermatophytoses (Almeida, 2008). Par ailleurs, un constituant sécrété de *M. canis* correspondant au surnageant de culture du champignon cultivé sur milieu Sabouraud liquide, nommé surnageant non induit (SNI ; par opposition au surnageant de culture obtenu en milieu enrichi en kératine qui induit la sécrétion de Sub3), provoque également des DTH chez le cobaye guéri d'une infection expérimentale (Tabart, 2008). Cela suggère que le SNI contient des antigènes (sous forme de protéines ou de polysaccharides) potentiellement intéressants pour le développement d'un vaccin.

Les constituants fongiques, sécrétés comme structuraux, interagissent avec les cellules de l'hôte et interviennent dans l'établissement de la réponse immune. Dans toutes les maladies infectieuses, la mise en place d'une réponse immune fait suite à une reconnaissance entre des molécules conservées exprimées par l'agent pathogène (*pathogen associated molecular pattern*, PAMP) et des récepteurs (*pattern recognition receptor*, PRR) de surface ou intracellulaires, exprimés par un grand nombre de cellules telles les phagocytes, les cellules hématopoïétiques et les cellules épithéliales (Kumagai *et al.*, 2008). Les différents PRR et PAMP ainsi que les mécanismes impliqués dans l'établissement de l'immunité antifongique sont détaillés plus bas dans l'introduction.

2. Immunité antifongique

2.1. Généralités sur la réponse immune

La réponse immune peut être définie comme l'activation des mécanismes du système immunitaire mis en place suite à la reconnaissance du « non-soi », à une agression ou à un dysfonctionnement de l'organisme. L'ensemble de ces systèmes permet la résilience immunitaire, notion qui recouvre la somme des mécanismes efficaces de défense d'un organisme vis-à-vis d'un agent pathogène (Janeway *et al.*, 2001). L'activation du système immunitaire par un agent pathogène est un phénomène complexe qui met en jeu deux mécanismes de défense distincts mais étroitement interconnectés : un mécanisme de défense non spécifique (réponse immune innée) et un mécanisme de défense spécifique (réponse immune adaptative). Parmi les mécanismes de défense non spécifique, les barrières physiques telles la peau et les muqueuses constituent une première ligne de défense contre les agents pathogènes.

2.2. Défenses cutanées

La peau est constituée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 12). L'épiderme, la couche la plus superficielle, est constituée d'un épithélium pavimenteux stratifié kératinisé de type Malpighien composé de cellules constitutives (les kératinocytes) et de cellules infiltrantes : les mélanocytes pigmentaires, les cellules dendritiques de Langerhans et les cellules mécanoréceptrices de Merkel (Prost-Squarcioni, 2006). L'épiderme ne contient pas de vaisseaux sanguins ni de vaisseaux lymphatiques mais contient de nombreuses terminaisons nerveuses. Les kératinocytes subissent une évolution morphologique ascensionnelle permanente liée au processus de kératinisation (Figure 13) (Fartasch, 2004 ; Prost-Squarcioni, 2006): une couche basale, constituée de cellules cubiques proliférant

activement assure le renouvellement constant de l'épiderme ; une couche spinocellulaire, composée de plusieurs assises de cellules à épines responsables de la nutrition des kératinocytes ; une couche granuleuse, composée de cellules très aplaties avec un noyau montrant des signes de dégénérescence et la présence de grains de kératohyaline dans le cytosol et enfin, une couche cornée, constituée de cellules mortes, dépourvues d'organites. Ces cellules sont dépourvues de jonctions cellulaires entre elles permettant le phénomène de desquamation. Le derme est un tissu conjonctif riche en fibres de collagène et en fibres élastiques. Il est parcouru de nombreux vaisseaux sanguins, vaisseaux lymphatiques, nerfs et terminaisons nerveuses ainsi que diverses annexes cutanées dérivées de l'épiderme et plongeant dans le derme (follicules pilo-sébacés, glandes sudoripares) (Prost-Squarcioni, 2006). L'hypoderme, la couche la plus profonde de la peau, est un tissu conjonctif lâche richement vascularisé qui contient du tissu adipeux (Prost-Squarcioni, 2006).

La peau intacte et ses annexes kératinisées constituent un moyen de défense considérable contre les dermatophytoses. L'existence d'une flore commensale ainsi que le renouvellement naturel de l'épiderme contribuent également à l'élimination du champignon. La faible humidité de la peau minimise les ressources disponibles en eau et ralentit par conséquent la croissance des dermatophytes (Ninomiya *et al.*, 1998). Les acides gras saturés du sébum ont des propriétés fongistatiques (Rothman *et al.*, 1946). Des peptides antimicrobiens, dont certains sont constitutivement produits par les kératinocytes (β -défensine-1) et d'autres induits par l'inflammation (β -défensine-2 et 3) sont aussi impliqués dans l'élimination des dermatophytes (Harder et Schroder, 2005). Enfin, chez le chat, le toilettage joue un rôle très important dans l'élimination des spores infectantes. Il semblerait aussi que les chats de race à poils longs, comme les Persans, sont plus fréquemment infectés de manière chronique que les autres (Mignon et Losson, 1997).

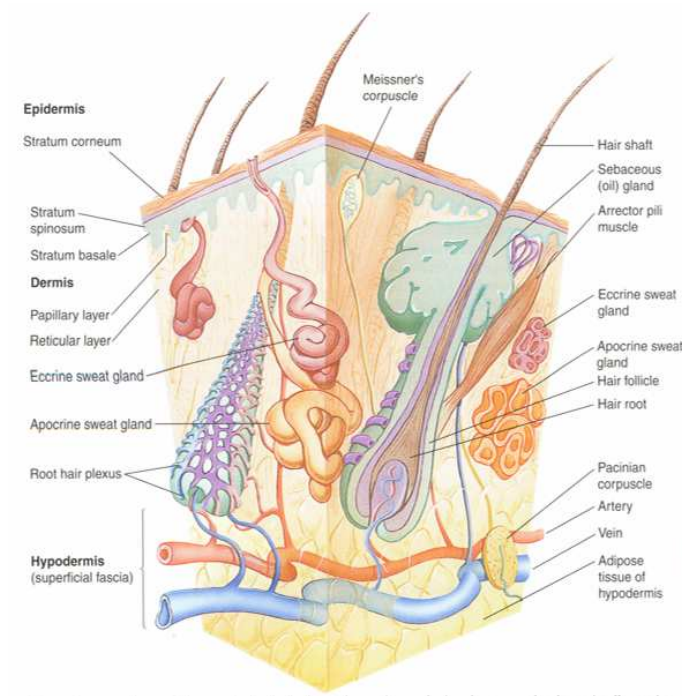


Figure 12. Représentation schématique de la peau humaine vue en coupe (Color atlas of histology, third edition, 2000. Leslie P. Gartner and James L. Hiatt. University of Maryland Ed Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore).

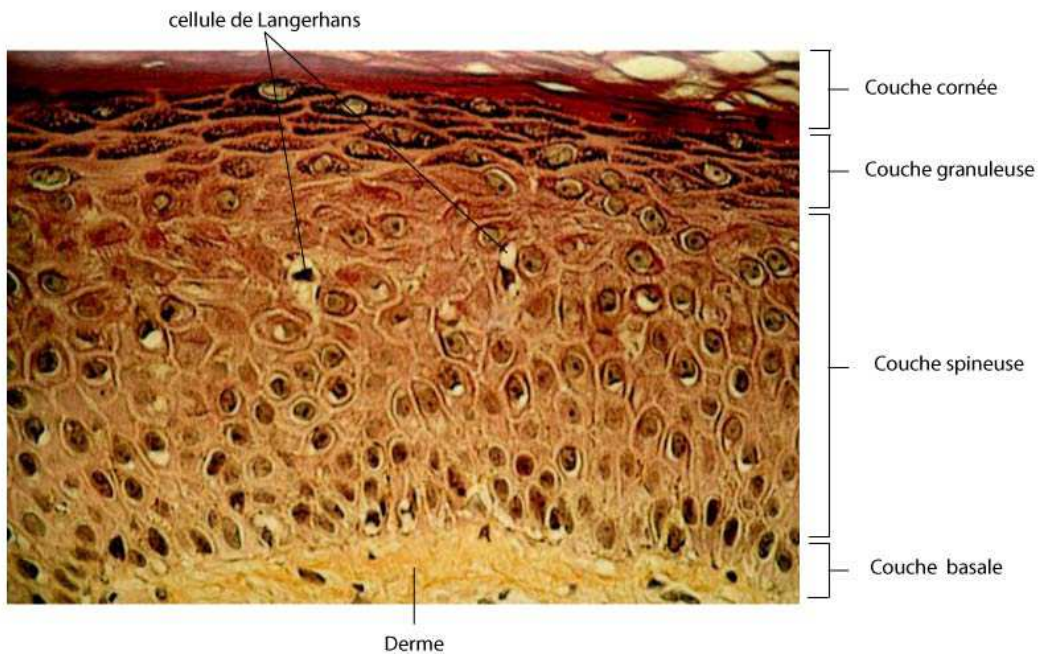


Figure 13. Examen histologique de la peau représentant les différentes couches de l'épiderme chez l'homme (<http://biologiedelapeau.fr>).

2.3. Reconnaissance fongique par le système immunitaire inné

Les PAMP fongiques sont détectés par des PRR membranaires qui permettent la reconnaissance directe (ou non-opsonique) du champignon par les cellules capables de phagocytose. Cependant, la reconnaissance de ces organismes peut aussi se faire de manière indirecte via des PRR solubles ou sécrétés (qui peuvent être produits par des cellules non phagocytaires) qui opsonisent l'agent pathogène. Les opsonines recouvrant le champignon sont ensuite reconnues par des PRR membranaires (Brown, 2011). Le système du complément représente un exemple de reconnaissance indirecte. Ainsi, les β -glucanes présents sur la paroi des champignons peuvent être reconnus par la forme inactive du composant C3 du complément. L'agent fongique opsonisé est ensuite reconnu par le récepteur du complément (*complement receptor*, CR) CR3 présent sur les cellules phagocytaires telles les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) (Rubin-Bejerano *et al.*, 2007). Bien que le rôle des anticorps dans l'immunité antifongique n'est pas connu de manière précise pour tous les champignons (Lopez-Ribot *et al.*, 2007), la production d'anticorps spécifiques faisant suite à l'établissement d'une réponse immune adaptative renforce également la reconnaissance des PAMP par les opsonines.

Les champignons sont reconnus par un large éventail de PRR membranaires et sécrétés (Tableau 2). Les PRR sont classés en différentes familles qui varient selon les auteurs. Selon Romani et collaborateurs (2011), les PRR sont répartis dans trois grandes familles : les *toll like receptors* (TLR), les *C-type lectin receptors* (CLR) et les *nucleotide oligomerization domain* (NOD)-*like receptors* (NLR).

Tableau 2. PRR et PAMP fongiques. D'après Brown (2011).

Localisation	PRR	PAMP
Sécrété/Soluble	Protéine du surfactant A	Mannane, glycoprotéine A ^{Pc}
	Protéine du surfactant D	Mannane, β -glucane
	Galectine-3	β 1,2-mannosides ^{Ca}
	Lectine liant le mannose	Mannane
	Pentraxine-3	Galactomannane ^{Af}
	Ficoline-2	β 1,3-glucane, N-Acetyl-D-glucosamine
	Complément	Surfaces fongiques, mannane, β 1,6-glucane
	Protéine C réactive	Phosphocholine
Membranaire*	TLR ¹ -1	Non connu
	TLR-2	Mannane, phospholipomannane ^{Ca} , GXM ²
	TLR-4	Mannane, Mannane de type O ^{Ca} , GXM ^{Cn}
	TLR-6	Non connu
	TLR-9	ADN fongique
	Dectine-1	β 1,3- et β 1,6-glucanes
	Dectine-2	α -mannane
	CR3	β -glucane, mannane, BAD-1 ^{Bd} , HSP60 ^{Hc} , GXM ^{Cn}
	DC-SIGN ³	Mannane, Galactomannane ^{Af}
	Récepteur du mannose	Mannane, Mannane de type N ^{Ca} , N-Acetyl-D-glucosamine, glycoprotéine A ^{Pc}
	CD14	Mannane, GXM ^{Cn}
	Fc γ R	Mannane, GXM ^{Cn}
	Mincle	α -mannose
	SCARF ⁴	Mannane, β -glucane
	CD36	β -glucane
	CD5	β -glucane
	<i>Very late antigen-5</i>	Cyclophiline A ^{Hc}
Langerine	Mannane, β -glucane	
Non connu	Non connu	Chitine

¹ *Toll like receptor*² *Glucuronoxylomannane*³ *Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin*⁴ *Scavenger receptor class F*^{Pc} *Pneumocystis carinii*, ^{Ca} *Candida albicans*, ^{Af} *Aspergillus fumigatus*, ^{Cn} *Cryptococcus neoformans*,^{Bd} *Blastomyces dermatidis*, ^{Hc} *Histoplasma capsulatum*

* Regroupe les récepteurs localisés en surface de la membrane cellulaire et dans les membranes intracytoplasmiques (endosomes, lysosomes).

Les toll like receptors

Les TLR sont des récepteurs très conservés par l'évolution (Roach *et al.*, 2005). Jusqu'à présent, 13 et 10 TLR ont été respectivement identifiés chez la souris et l'homme (Kumagai *et al.*, 2008). Les TLR sont des récepteurs membranaires pouvant être exprimés en surface des cellules ou localisés dans les compartiments membranaires intracytoplasmiques tels les endosomes et les lysosomes. Les TLR-1, 2, 4, 5, 6 et 10 sont des récepteurs de surface tandis que les TLR-3, 7, 8 et 9 sont des récepteurs intracytoplasmiques. Les TLR sont exprimés par de nombreuses cellules incluant les monocytes, les macrophages, les PMN et les cellules dendritiques (*dendritic cells*, DC) (Cunha *et al.*, 2010). La voie d'activation des TLR est complexe et fait intervenir de nombreux facteurs de transcription et des kinases (Figure 14). Elle comporte une voie dépendante du facteur de différenciation myéloïde-88 (*myeloid differentiation factor 88*, MyD88) qui est commune à tous les TLR et une voie indépendante du facteur MyD88 qui est propre aux TLR-3 et 4 (Hashimoto *et al.*, 1988). L'activation du facteur MyD88 induit une cascade d'activation menant à l'activation en aval de kinases et à la translocation des facteurs de transcription NF- κ B (*nuclear factor kappa B*) et IRF-3 (*interferon regulatory factor 3*) (Kawai et Akira, 2007). Plus spécifiquement, le facteur MyD88 s'associe au domaine TIR (*toll/interleukin (IL)-1 receptor*) via la molécule adaptatrice MAL (*Myd88 adapter-like*) aussi dénommée TIRAP (*TIR domain-containing adaptor protein*) qui permet le recrutement du récepteur IRAK (*IL-1 receptor-associated kinase*) et par la suite le récepteur TRAF-6 (*tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor*), résultant finalement en l'activation du complexe IKK (I κ B Kinase).

Dans la voie de signalisation indépendante du facteur MyD88, la molécule adaptatrice TRIF (*TIR domain-containing adaptor inducing interferon (IFN)- β*) est recrutée au récepteur intracellulaire TLR-3 directement (Yamamoto *et al.*, 2003) ou au récepteur TLR-4 via la molécule TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) (Fitzgerald *et al.*, 2003b). Ce recrutement entraîne l'activation des deux molécules TRAF-6 et TBK-1 (*tank-binding kinase 1*) induisant respectivement une réponse immune dépendante du facteur de transcription NF- κ B ou dépendante du facteur de transcription IRF-3 (Fitzgerald *et al.*, 2003a). La caractéristique la plus importante de l'activation des TLR est l'activation *in fine* de cytokines pro-inflammatoires telles le TNF- α et l'IL-12 pour les TLR favorisant la voie d'activation NF- κ B et l'IFN α/β pour les TLR favorisant la voie d'activation IRF-3 (Dabbagh et Lewis, 2003).

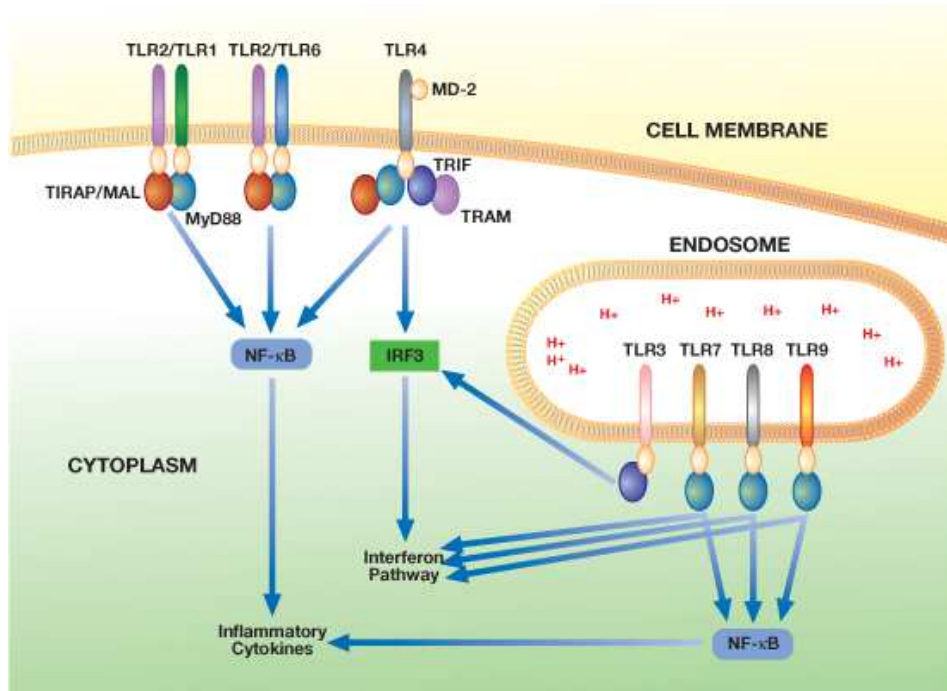


Figure 14. Schéma simplifié de la voie d'activation des TLR. D'après MacKichan (2005).

L'activation de la voie des TLR induit le recrutement et l'activation de nombreuses molécules qui, en fin de compte, entraîne la libération de cytokines pro-inflammatoires via la voie d'activation NF- κ B ou la libération d'interférons via la voie d'activation IRF3. Les TLR peuvent être localisés en surface de la membrane cellulaire ou dans les compartiments membranaires intracytoplasmiques des endosomes. Ces récepteurs diffèrent selon les molécules adaptatrices auxquelles ils peuvent s'associer. Certaines de ces molécules ont été caractérisées (TIRAP/MAL, MyD88, TRIF, TRAM) mais d'autres doivent encore être définies.

Le rôle des TLR dans l'induction d'une réponse immune antifongique a été démontré dans plusieurs études récentes. Les TLR-2, TLR-4 et TLR-9 sont les principaux TLR impliqués dans la reconnaissance des composants fongiques tels le zymosan, les phospholipomannanes, les mannanes de type O et l'ADN fongique (van de Veerdonk *et al.*, 2008). Plus particulièrement, les récepteurs TLR-2 et 4 des monocytes et des PMN humains participent à la reconnaissance des PAMP de *Paracoccidioides brasiliensis*, un champignon responsable d'une mycose grave et endémique en Amérique latine (Bonfim *et al.*, 2009). Le TLR-2 et le TLR-4 sont également impliqués, respectivement, dans la reconnaissance des phospholipomannanes de *C. albicans* (Li *et al.*, 2009) et des mannanes de ce même champignon (Tada *et al.*, 2002). Le TLR-4 intervient dans la reconnaissance des composants fongiques d'*A. fumigatus* (Wang *et al.*, 2001) et dans l'activation et la production de cytokines en réponse à l'infection (Bellocchio *et al.*, 2004a). Le rôle du TLR-2 au cours d'une

aspergillose demeure controversé. Pour certains auteurs, il n'interviendrait pas dans la reconnaissance de composants fongiques d'*A. fumigatus* (Wang *et al.*, 2001 ; Bellocchio *et al.*, 2004a) tandis que pour d'autres il serait nécessaire pour la résolution de l'infection (Balloy *et al.*, 2005). Le récepteur membranaire intracytoplasmique TLR-9 peut quant à lui reconnaître l'ADN fongique (Nakamura *et al.*, 2008 ; Ramirez-Ortiz *et al.*, 2008 ; Miyazato *et al.*, 2009) et son rôle dans l'induction d'une réponse immune protectrice antifongique a été démontré pour *C. albicans* (Bellocchio *et al.*, 2004a) et pour *A. fumigatus* (Ramirez-Ortiz *et al.*, 2008). Toutes ces études démontrent le rôle prépondérant des récepteurs de type toll dans l'induction d'une réponse immune antifongique.

Les C-type lectin receptors

Les CLR sont des récepteurs centraux pour la reconnaissance fongique et pour l'induction d'une réponse immune innée et adaptative (Romani, 2011). Les principaux membres de la famille des CLR sont la dectine-1, la dectine-2, le mincle, le DC-SIGN (DC-specific ICAM3-grabbing non-integrin), le récepteur au mannose, la langerine et la lectine liant le mannose (Brown, 2011). Parmi eux, la dectine-1 et la dectine-2, ont un rôle prédominant dans la reconnaissance fongique (Bettelli *et al.*, 2007). La dectine-1 est un PRR présent à la surface des monocytes et des DC capable de reconnaître le β 1,3- et le β 1,6-glucane. La reconnaissance par la dectine-1 du β -glucane induit une réponse immune protectrice contre les agents infectieux fongiques tels que *C. albicans*. Le blocage de la dectine-1 sur des DC immatures a montré que celles-ci étaient moins aptes à phagocyter et à tuer *C. albicans* (Skrzypek *et al.*, 2009). Cette étude a également prouvé que la dectine-1 intervient dans la maturation des DC et dans l'activation des lymphocytes. La dectine-2 a également un rôle important dans la reconnaissance des PAMP fongiques (Robinson *et al.*, 2009). Dans un modèle d'infection à *C. albicans*, le blocage de la dectine-2 n'affecte pas l'immunité innée mais inhibe la production d'IL-17 par les cellules T spécifiques. Une autre expérience, utilisant des souris déficientes pour la dectine-2, a démontré que ce PRR est déterminant dans la mise en place d'une réponse immune protectrice au cours d'une candidose (Saijo *et al.*, 2010).

Les nucleotide oligomerization domain (NOD)-like receptors

Les NLR sont des récepteurs intracytoplasmiques impliqués dans la reconnaissance fongique. L'activation de ces récepteurs induit la production d'IL-1 β et d'IL-18 via la

formation d'inflammasomes (van de Veerdonk *et al.*, 2008 ; Joly *et al.*, 2009 ; Said-Sadier *et al.*, 2010). Plusieurs études ont démontré l'implication des NLR dans l'induction d'une réponse immune au cours d'une candidose. Ainsi, des souris déficientes en NLRP3, un récepteur de type NLR, sont plus sensibles à l'infection que leur homologue sauvage (Gross *et al.*, 2006 ; Gross *et al.*, 2009).

Peu d'études ont été consacrées à l'étude de l'implication des PRR dans l'induction d'une réponse immune au cours d'une dermatophytose. Parmi elles, aucune n'a permis d'affirmer que les PRR étudiés étaient impliqués dans la reconnaissance des PAMP fongiques et intervenaient dans l'établissement d'une réponse immune protectrice anti-dermatophytes, mais elles ont cependant démontré que certains récepteurs étaient surexprimés *in vitro* (Chung *et al.*, 2009 ; García-Madrid *et al.*, 2011) et *in vivo* (Nakamura *et al.*, 2012) en réponse à l'infection.

Il a donc clairement été établi que les PRR ont un rôle dans l'induction d'une réponse immune protectrice lors d'infections fongiques. Néanmoins, certains champignons ont mis en place des mécanismes d'immuno-évasion en exploitant cette stratégie de reconnaissance par les PRR. Plusieurs études ont ainsi démontré comment certains champignons pathogènes peuvent utiliser les PRR pour soit diminuer les activités antimicrobiennes des leucocytes ou échapper au système immunitaire (Netea *et al.*, 2007).

2.4. Réponse immune cellulaire

Le système immunitaire adaptatif a mis en place deux systèmes de défense spécifique contre les agents pathogènes : l'immunité à médiation cellulaire faisant intervenir les lymphocytes T et l'immunité à médiation humorale liée aux lymphocytes B et à la production d'anticorps par des plasmocytes. Les lymphocytes B peuvent reconnaître les épitopes de l'antigène dans leur forme native alors que les lymphocytes T reconnaissent les épitopes des peptides de l'antigène présentés par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Janeway *et al.*, 2001).

Les mécanismes impliqués dans la mise en place d'une réponse immune cellulaire sont illustrés dans la figure 15. Lorsqu'un antigène est reconnu par une cellule présentatrice d'antigènes (CPA), celui-ci va être transformé en peptide antigénique puis présenté aux lymphocytes T via le CMH présent sur les CPA. Selon le CMH impliqué, les lymphocytes vont se différencier en lymphocytes CD4⁺ (CMH II) ou CD8⁺ (CMH I) (Joffre *et al.*, 2009). Les lymphocytes T CD4⁺ appelés lymphocytes T *helper* peuvent emprunter quatre voies de

différenciation différentes : la voie Th1, Th2, Th17 ou Treg selon le type de cytokines sécrétées. L'IL-12 est la principale cytokine associée à la voie Th1 tandis que l'IL-4 correspond à la voie Th2. Le TGF (*transforming growth factor*)- β , seul, permet l'induction de la voie Treg tandis que s'il est associé à l'IL-6, il orientera le lymphocyte T vers la voie Th17. L'activation des différentes voies est permise par l'activation d'un facteur de transcription propre à chaque voie. Il s'agit du T-bet (*T-box expressed in T-cells*) pour la voie Th1, du GATA-3 (*guanine adenine thymine adenine binding protein 3*) pour la voie Th2 (Chakir *et al.*, 2003), du ROR γ (*retinoid-related orphan receptor gamma*) pour la voie Th17 (Korn *et al.*, 2009) et du Foxp3 (*forkhead box protein 3*) pour les cellules Treg (Zhou *et al.*, 2008). Les cellules différenciées en lymphocytes Th1, Th2 ou Th17 produisent principalement et respectivement de l'IFN (interféron)- γ , de l'IL-4 et de l'IL-17. Les lymphocytes Treg quant à eux, produisent de l'IL-10 et du TGF- β . Il est important de signaler que l'engagement dans une voie mène à l'inhibition de la différenciation dans une autre. Ainsi, l'IFN- γ inhibe l'activation de GATA-3, Foxp3 et de ROR γ t ; l'IL-4 inhibe T-bet, Foxp3 et ROR γ t ; le TGF- β inhibe l'activation de T-bet et de GATA-3 et enfin, l'IL-6 inhibe l'activation de Foxp3.

Dans la plupart des infections fongiques, la réponse immune protectrice est de type cellulaire et implique les cellules de type Th1 (Blanco et Garcia, 2008). Il en est de même pour les dermatophytoses. En effet, la réponse immune anti-dermatophytes est considérée comme résultant d'une activation de la voie Th1 et de la production d'IFN- γ (Almeida, 2008 ; Mignon *et al.*, 2008). Cependant, de nouvelles études démontrent que les lymphocytes Th17 interviennent dans la mise en place de la réponse immune protectrice au cours de nombreuses infections fongiques (Cambier *et al.*, 2011). L'implication des lymphocytes Th17 dans l'immunité antifongique a été récemment démontrée pour la candidose et l'aspergillose (Bozza *et al.*, 2008 ; Romani, 2008 ; Zelante *et al.*, 2008 ; Gaffen *et al.*, 2009, Saijo *et al.*, 2010). L'immunité anti-dermatophytes pourrait elle aussi faire intervenir la voie Th17. En effet, l'étude du profil cytokinique de kératinocytes humains stimulés *in vitro* par *A. benhamiae* a révélé une production importante d'IL-8, d'IL-1 β , d'IL-6 et d'IL-17 et dans une moindre mesure une production d'IFN- γ et d'IL-12. Cette étude n'a pas fait de lien direct avec la voie Th17, mais au vu du profil cytokinique généré, la voie Th17, plus que la voie Th1, pourrait avoir un rôle prépondérant dans la mise en place d'une réponse immune protectrice anti-dermatophytes (Shiraki *et al.*, 2006). Plus récemment, une étude *in vivo* a démontré qu'un antigène de *T. mentagrophytes* induisait l'expression d'IFN- γ et d'IL-17A dans les ganglions lymphatiques ainsi que la production d'IL-1 β , IFN- γ , IL-6 et IL-23 dans la peau des souris inoculées, suggérant que non seulement la voie Th1, mais aussi la voie Th17,

étaient impliquées dans l'établissement de la réponse immune au cours de l'infection (Nakamura *et al.*, 2012).

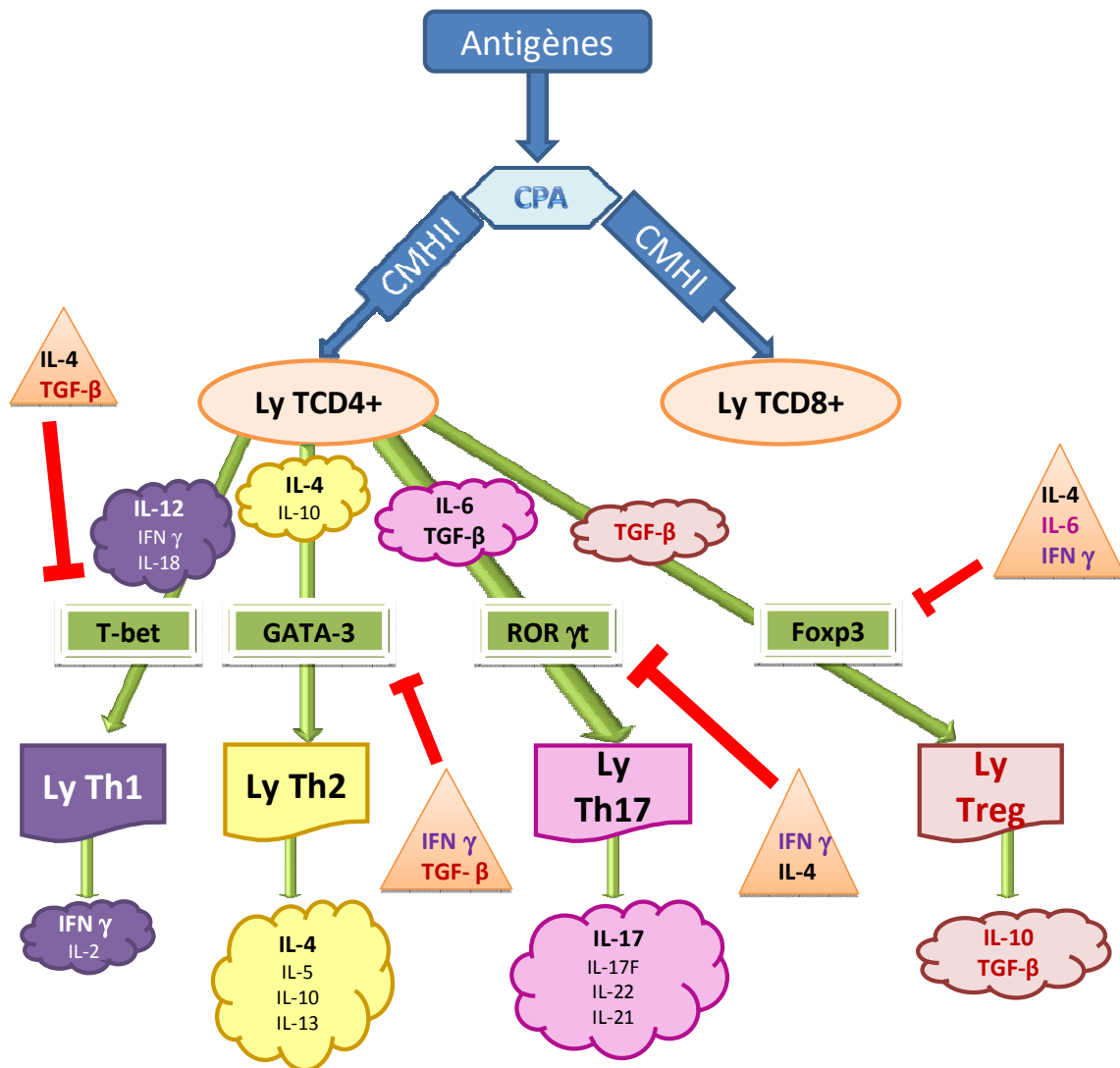


Figure 15. Schéma simplifié des principales voies d'activation lors de la mise en place d'une réponse immune cellulaire chez la souris.

2.5. Réponse en anticorps

Contrairement à la réponse à médiation cellulaire, la réponse immune humorale au cours des infections fongiques ne semble pas être indispensable pour la résolution de l'infection (Romani, 2011). Néanmoins, il a été démontré que la réponse à médiation humorale pouvait être protectrice lorsque certains types d'anticorps étaient produits en quantité suffisante. Les principales fonctions reconnues des anticorps dans les infections fongiques incluent la prévention de l'adhérence, la neutralisation de toxines, l'opsonisation, la cytotoxicité cellulaire et l'établissement d'une réponse immune mémoire (Lopez-Ribot *et al.*, 2007). Au cours d'infections fongiques provoquées par *Cryptococcus neoformans* et *C. albicans*, des anticorps protecteurs et non protecteurs ont été identifiés indiquant que la réponse immune humorale induite par ces deux champignons était corrélée avec une production d'anticorps dont l'efficacité est variable (Casadevall, 1995).

Plusieurs études ont mis en évidence la mise en place d'une réponse humorale spécifique lors de dermatophytoses chez l'homme et l'animal. Cependant, le rôle exact de la réponse humorale anti-dermatophytes n'est pas encore bien connu. Chez l'homme par exemple, le taux d'Immunoglobulines (Ig) de type G est faible chez les personnes qui développent une réponse de type cellulaire et qui surmontent l'infection. En revanche, chez les individus infectés de manière chronique, le taux d'IgG et d'IgE est élevé (Swan *et al.*, 1983 ; Woodfolk et Platts-Mills, 2001). Au cours d'une dermatophytose à *M. canis* chez le chat, des anticorps spécifiques sont produits en réponse à l'infection (DeBoer et Moriello, 1994 ; Sparkes *et al.*, 1994 ; Mignon *et al.*, 1999a ; Brouta *et al.*, 2003 ; Descamps *et al.*, 2003b) mais aucune relation entre la présence de ces anticorps et la guérison n'a pu être mise en évidence. Chez l'homme, lors d'une dermatophytose causée par *Trichophyton* sp., des taux élevés d'anticorps dans le sang, en particulier d'IgE et IgG4, sont associés à des dermatophytoses chroniques (Kaaman *et al.*, 1981 ; Woodfolk *et al.*, 1996). De plus, chez la souris, le transfert d'anticorps ne protège pas le receveur contre l'infection (Calderon et Hay, 1984b). Néanmoins, il est impossible d'exclure le fait que des anticorps puissent avoir un effet fongicide notamment via l'opsonisation ou l'activation du complément (Swan *et al.*, 1983). Les anticorps pourraient également jouer un rôle dans l'inactivation des protéases kératinolytiques sécrétées par les dermatophytes (Grappel et Blank, 1972).

2.6. Rôle des cellules immunitaires

Les premières cellules rencontrées par le champignon lors d'une dermatophytose sont les kératinocytes qui peuvent produire une large gamme de cytokines en réponse à l'infection incluant l'IL-8, qui induit le recrutement de PMN, et le TNF- α (Nakamura *et al.*, 2002). Les premiers leucocytes recrutés au site d'infection sont les PMN (Hay *et al.*, 1988). Ces cellules, avec les macrophages, sont responsables *in fine* de l'élimination des dermatophytes (Calderon et Hay, 1987 ; Heddergott *et al.*, 2012). Seules les principales cellules intervenant directement dans la mise en place de la réponse immune anti-dermatophytes seront décrites dans ce paragraphe ; le rôle des lymphocytes T et B ne sera pas abordé.

Les kératinocytes

Les kératinocytes sont les premières cellules que le dermatophyte va rencontrer au cours de l'infection. Les kératinocytes possèdent une grande capacité de phagocytose. Ils peuvent phagocyter des particules fongiques via les PRR qu'ils expriment. Parmi eux, plusieurs sont capables de reconnaître des PAMP fongiques, tels les TLR-2 et TLR-4. Par exemple, les phospholipomannanes de *C. albicans* induisent une réponse inflammatoire en se fixant sur le TLR-2 des kératinocytes (Li *et al.*, 2009). Les TLR-2 et TLR-4 des kératinocytes sont également impliqués dans la mise en place de la réponse immune anti-*C. albicans* (Pivarcsi *et al.*, 2004). Les TLR des kératinocytes seraient aussi impliqués dans la reconnaissance des PAMP au cours d'une dermatophytose. En effet, une diminution de l'expression du TLR-2 et du TLR-6 est observée dans les kératinocytes humains stimulés par des conidies intactes de *T. rubrum* alors qu'un broyat de conidies induit une augmentation de l'expression des TLR-2, TLR-4 et TLR-6 dans ces cellules (García-Madrid *et al.*, 2011).

Dans l'épiderme, la reconnaissance d'agents pathogènes déclenche la production de cytokines par les kératinocytes menant à l'élimination du champignon et à l'activation du système immunitaire adaptatif (Pivarcsi *et al.*, 2004). Au cours d'une dermatophytose à *M. canis*, les kératinocytes produisent du TNF- α , de l'IL-1 β , de l'IL-10 et de l'IL-18 lorsqu'ils sont stimulés par des arthrospores vivantes ainsi que différents constituants fongiques (Tabart, 2008). Les kératinocytes, lorsqu'ils sont infectés *in vitro* par *A. benhamiae*, sont également capables de produire d'autres cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IL-8, l'IL-17 ainsi que de l'IFN- γ et de l'IL-12 (Shiraki *et al.*, 2006). Les dermatophytes peuvent donc induire la production de cytokines pro-inflammatoires par les kératinocytes. Cependant, cette réponse cytokinique inflammatoire varie selon le dermatophyte infectant. Ainsi, une étude a démontré que la production de cytokines par des kératinocytes humains

était fortement augmentée lorsqu'ils étaient stimulés par *T. mentagrophytes*, un dermatophyte zoophile, tandis que ce n'était pas le cas lorsque les cellules étaient cultivées avec *T. rubrum* ou *T. tonsurans*, deux dermatophytes anthropophiles (Tani *et al.*, 2007).

Les polymorphonucléaires neutrophiles

Les PMN sont des cellules sanguines appartenant à la lignée blanche (leucocytes). Ils doivent leur nom à l'hétérogénéité morphologique de leur noyau, présentant de deux à cinq lobes. Le qualificatif de « neutrophile » est lié à une caractéristique tinctoriale en microscopie optique : après ajout des colorants vitaux usuels (May-Grünwald Giemsa), ces cellules restent neutres car elles fixent mal les colorants acides et basiques (Figure 16). Les PMN deviennent matures dans la moelle osseuse après 7 à 14 jours. Durant leur maturation, ils vont passer par six stades morphologiques différents : myéloblaste, promyéloblaste, myélocyte, métamyélocyte, neutrophile non segmenté et neutrophile segmenté (Dockrell *et al.*, 2007). Le cytoplasme du PMN mature contient des granules primaires, secondaires et tertiaires. Les granules primaires (azurophiles) contiennent des protéines cationiques, de la myéloperoxidase, des métalloprotéinases de matrice et des hydrolases. Les granules secondaires sont composés de collagénase, de lactoferrine et d'histaminase. Les PMN immatures possèdent une importante capacité à synthétiser des granules grâce à leur appareil de Golgi très actif et leur réticulum endoplasmique. Ceux-ci disparaissent chez les PMN matures qui ne peuvent par conséquent plus synthétiser de nouveaux granules.

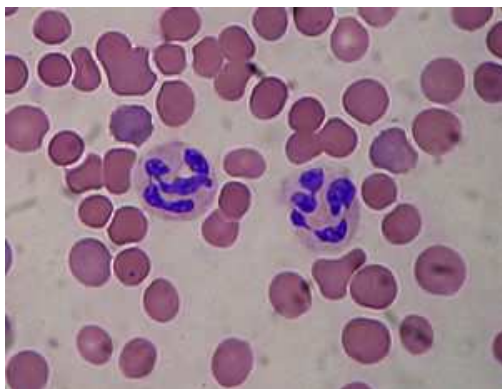


Figure 16. Frottis sanguin réalisé chez l'homme montrant deux polymorphonucléaires neutrophiles à 4 et 5 lobes nucléaires, entourés de nombreux globules rouges (coloration May-Grünwald Giemsa) (http://fr.wikipedia.org/wiki/Granulocyte_neutrophile).

Au cours d'une infection fongique, les PMN circulant dans le sang sont recrutés au site d'infection via la production d'IL-8 et de GRO (*growth-related oncogene alpha*)- α par les kératinocytes (Nakamura *et al.*, 2002 ; Tani *et al.*, 2007), via le facteur C3a du complément,

dont la voie alterne est activée par *T. rubrum* (Swan *et al.*, 1983 ; Dahl et Carpenter, 1986), ou via les LILA (*lipid-like leucocyte activators*) produits par les dermatophytes et ayant la capacité d'attirer directement les PMN (Kahlke *et al.*, 1996). Pour éliminer l'agent pathogène, les PMN disposent de différentes armes, la principale et la plus connue étant la phagocytose qui requiert la reconnaissance des PAMP fongiques par les PRR des PMN. Les levures sont facilement phagocytées tandis que les champignons filamenteux sont plus souvent phagocytés lorsqu'ils sont sous forme de spores (Brakhage *et al.*, 2010). Les PMN agissent principalement en produisant des ions superoxydes via l'iNOS (*inducible nitric oxide synthetase*). Ces ions, qui ont tous pour origine la production d'anions superoxydes par des NADPH oxydases, sont de deux types, des *reactive oxygen intermediates*, parmi lesquels le peroxyde d'hydrogène, les radicaux hydroxyl et l'hypochlorite et des *reactive nitrogen intermediates*, parmi lesquels l'oxyde nitrique qui est produit en très grande quantité. Ces ions agissent en oxydant les molécules fongiques et le champignon phagocyté est alors tué (Dockrell *et al.*, 2007). La phagocytose d'éléments fongiques de grande taille par les PMN, résultant par exemple de la germination et la croissance de spores, n'est pas possible. Les PMN disposent cependant d'autres mécanismes de défense. Ils peuvent relarguer le contenu de leurs granules et de l'ADN pour former le NET (*neutrophil extracellular trap*). Cette toile d'araignée, composée de fibres d'ADN couvertes de granules et de protéines cytosoliques (Urban *et al.*, 2009), emprisonne le champignon, prévient sa dissémination et peut favoriser le recrutement de PMN et d'autres cellules immunitaires au site d'infection (Brakhage *et al.*, 2010). Récemment, la formation de NET par les PMN en réponse au dermatophyte *A. benhamiae* a été démontrée (Heddergott *et al.*, 2012).

Parmi les TLR exprimés par les PMN, les TLR-2 et 4 sont les récepteurs qui ont été le plus étudiés (Prince *et al.*, 2011). Le TLR-2 forme un hétérodimère avec le TLR-1 reconnaissant les peptides diacylés tandis que le TLR-4 reconnaît le lipide A, composant du lipopolysaccharide (LPS) (Takeuchi et Akira, 2010). Les PMN expriment également des co-récepteurs incluant le CD-14 et le CD-11b/CD-18 qui coopèrent avec le TLR-4 ou le TLR-2 au niveau de la membrane plasmique (Chow *et al.*, 1999 ; Perera *et al.*, 2001). Le TLR-5 des PMN reconnaît la flagelline de certaines bactéries comme *Listeria monocytogenes* (Hayashi *et al.*, 2001). En ce qui concerne les récepteurs intracytoplasmiques, les PMN sont également capables de reconnaître les ligands des TLR-8 et 9 mais ne semblent pas exprimer de TLR-3 ni de TLR-7 (Hattermann *et al.*, 2007 ; Tamassia *et al.*, 2008 ; Janke *et al.*, 2009). Les TLR des PMN sont également impliqués dans la reconnaissance de PAMP fongiques comme en témoignent de nombreuses études. Chez l'homme, la stimulation des PMN avec des conidies

ou des hyphes d'*A. fumigatus* induit l'expression des TLR-2, 4, 6, 8, 9 et 10, qui varie selon la nature de l'inoculum fongique utilisé pour l'infection (Bellocchio *et al.*, 2004b). Une autre étude a démontré que les PMN sont capables de produire *in vitro* du TLR-2, du TLR-4 et de la dectine-1 lorsqu'ils sont stimulés par *P. brasiliensis* (Bonfim *et al.*, 2009). En utilisant un modèle d'infection sur épithélium humain reconstruit, Weindl et collaborateurs (2007) ont, quant à eux, montré que la réponse immune protectrice mise en place au cours d'une candidose orale impliquait le TLR-4 et que ce mécanisme protecteur était dépendant des PMN.

En plus de leur capacité à agir directement sur l'agent pathogène (Kumar et Sharma, 2010), les PMN peuvent produire des cytokines (Cassatella, 1995) et interagir directement avec les DC (Bennouna *et al.*, 2003 ; van Gisbergen *et al.*, 2005 ; Megiovanni *et al.*, 2006 ; Charmoy *et al.*, 2010), ce qui indique qu'ils sont également des acteurs du système immunitaire adaptatif. Au cours d'une infection provoquée par *C. albicans*, les PMN sont attirés sur le site d'infection et libèrent des cytokines telles que l'IL-1 α , l'IL-1 β , l'IL-8, le TNF- α et le GM-CSF (*granulocyte macrophage colony stimulating factor*) capables d'orienter la réponse immune vers la voie Th1 (Schaller *et al.*, 2004). Les PMN peuvent également produire de l'IL-8 en réponse au dermatophyte *A. benhamiae* (Heddergott *et al.*, 2012), ainsi que lors d'une infection fongique provoquée par *P. brasiliensis* (Acorci-Valério *et al.*, 2010). Lorsqu'ils sont stimulés par des constituants de la paroi fongique de *S. cerevisiae* et de *C. albicans*, les PMN produisent également du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-8 (Saegusa *et al.*, 2009). Suite à une stimulation par un agent pathogène fongique, les PMN sont donc capables de produire des cytokines pro-inflammatoires. De plus, ces cellules peuvent également se comporter comme des CPA (Abdallah *et al.*, 2011) et produire de l'IFN- γ (Yin et Ferguson, 2009) et de l'IL-17 (Pelletier *et al.*, 2010). Dès lors, il serait intéressant d'étudier le rôle des PMN dans la mise en place d'une dermatophytose à *M. canis*.

Les macrophages

Les macrophages se développent à partir de monocytes sanguins dont les précurseurs sont produits dans la moelle osseuse hématopoïétique. Lorsqu'un monocyte quitte le sang et infiltre un tissu en traversant l'endothélium vasculaire, il subit sa différenciation terminale pour devenir un macrophage (Gordon, 2001). Les macrophages contribuent à l'homéostasie en évacuant les cellules sénescents et/ou apoptotiques et via le remodelage et la réparation des tissus après l'inflammation. Ces cellules jouent également un rôle important dans l'immunité par la phagocytose d'agents exogènes. De plus, comme les PMN, ils sont capables

de sécréter des cytokines après leur activation qui permettent la migration et l'activation d'autres cellules immunitaires (Gordon, 2001).

Lors d'une infection fongique, les macrophages interviennent dans la mise en place d'une réponse immune. Le champignon *P. brasiliensis* induit une diminution de l'expression des récepteurs TLR-1, 2 et 4 ainsi que de la dectine-1 dans les macrophages stimulés (Bonfim *et al.*, 2009) indiquant que ces PRR sont probablement impliqués dans la reconnaissance de PAMP de *P. brasiliensis*. Les macrophages semblent aussi être impliqués dans les mécanismes mis en œuvre par les dermatophytes pour échapper à la phagocytose. En effet, une étude a démontré que les filaments mycéliens de *T. rubrum* sont capables de croître à l'intérieur des macrophages (Campos *et al.*, 2006). De plus, les conidies de *T. rubrum* expriment à leur surface des adhésines leur permettant de pénétrer activement dans les macrophages et les cellules épithéliales (Esquenazi *et al.*, 2003 ; Esquenazi *et al.*, 2004).

Les cellules dendritiques

Les DC sont des CPA professionnelles. Elles sélectionnent les lymphocytes T CD8+ ou CD4+ en leur présentant le peptide antigénique via le CMH de classe 1 ou 2 respectivement (Joffre *et al.*, 2009).

Les DC dérivent d'un progéniteur hématopoïétique. Au cours de la différenciation dans la moelle osseuse, les précurseurs s'orientent soit vers la lignée monocyttaire, soit vers la lignée dendritique. Le progéniteur des DC, appelé DCP (*dendritic cell progenitor*) génère des DC myéloïdes (ou classiques), et des DC plasmacytoïdes. Ces dernières sécrètent de grandes quantités d'IFN de type I en réponse aux infections virales (Grouard *et al.*, 1997 ; Siegal *et al.*, 1999). Les DC myéloïdes sont réparties en trois sous-groupes selon l'endroit où elles se trouvent : les DC localisées dans les tissus périphériques, les DC résidant dans les organes lymphoïdes et les DC circulant dans le sang et la lymphe (Ueno *et al.*, 2007). Dans la peau, deux types distincts de DC sont présents ; les cellules de Langherans qui résident dans l'épiderme et les DC interstitielles qui se trouvent dans le derme (Valladeau et Saeland, 2005).

Au cours d'une dermatophytose, les DC vont permettre l'activation du système immunitaire adaptatif en reconnaissant des molécules fongiques via leur PRR. Chung et collaborateurs (2009) ont démontré que le récepteur DC-HIL (*dendritic cell-associated heparin sulfate proteoglycan-dependent integrin ligand*) des DC non seulement reconnaît des constituants présents sur la paroi fongique de *T. rubrum* induisant la mise en place d'une réponse immune innée mais agit aussi comme inhibiteur de la réponse immune adaptative en

se fixant au récepteur SD-4 (*syndecan-4*) des lymphocytes T activés. Une récente étude a démontré qu'en réponse au dermatophyte *A. benhamiae*, les DC produisent des cytokines telles le TNF- α , l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-10 (Heddergott *et al.*, 2012). Des recherches effectuées dans notre laboratoire ont démontré que les DC félines produisent de l'IL-12 lorsqu'elles sont stimulées tant par des arthrospores de *M. canis* tuées par la chaleur que des arthrospores vivantes séparées physiquement des cellules par un insert de culture (Tabart, 2008). Ces études ont également démontré que les arthrospores tuées diminuaient le taux de CMH II exprimé à la surface des DC tandis que les arthrospores placées dans un insert ainsi que l'exoantigène (l'ensemble des protéines sécrétées par *M. canis* cultivé dans un milieu contenant de la kératine féline comme unique source d'azote), rSub3 et rMep3 induisaient une augmentation du taux de CMH II. Ces résultats indiquent que les DC interviennent dans la mise en place d'une réponse immune au cours d'une infection provoquée par *M. canis* et que certains constituants fongiques pourraient être impliqués dans des mécanismes d'immuno-évasion.

3. La vaccination contre les dermatophytes

Les dermatophytoses ne mettant pas en jeu le pronostic vital, dans la majorité des cas, les recherches menées sur le développement de vaccins ont souffert d'un désintérêt général (Mignon *et al.*, 2008). Néanmoins, l'efficacité partielle conférée par quelques vaccins expérimentaux a été démontrée. Par ailleurs, plusieurs vaccins commerciaux ont été développés contre divers dermatophytes dont *M. canis*, *T. mentagrophytes* et *T. verrucosum*, mais très peu d'études objectives ont permis de démontrer leur efficacité.

3.1. Les vaccins commerciaux

Les seuls vaccins contre les dermatophytoses qui ont été commercialisés en Belgique, et qui le sont encore dans d'autres pays, étaient des vaccins à usage vétérinaire. Il s'agit de vaccins entiers, inactivés ou atténués. Très peu d'informations sont disponibles quant à leur efficacité, à la durée de protection qu'ils induisent ou à leurs effets secondaires. Beaucoup d'entre eux ont également une indication thérapeutique.

Un vaccin non adjuvanté constitué d'une souche atténuée de *T. verrucosum* (LFT-130) a été développé en Russie dans les années 1960 et est toujours commercialisé aujourd'hui, notamment en France, sous le nom de Bovilis® Ringvac par la firme Intervet. Son utilisation dans le cadre de programmes prophylactiques à grande échelle en Europe de l'Est et dans les

pays scandinaves a permis la réduction drastique de l'incidence de l'infection dans les élevages de bovins, et indirectement chez l'homme (Gudding et Naess, 1986 ; Lund et Deboer, 2008). Plus récemment, une étude réalisée par Intervet a démontré que ce vaccin atténué, administré en prévention à des veaux de boucherie, permettait de réduire drastiquement la fréquence des lésions de dermatophytose observée chez les animaux lors de l'abattage (Kujik *et al.*, 2004). Ce vaccin apparaît donc efficace mais n'est économiquement rentable que chez les animaux destinés à la boucherie abattus avant l'âge d'un an et pour lesquels une seule dose du vaccin peut suffire à protéger les animaux de la maladie. Actuellement, le Bovilis® Ringvac n'est plus disponible en Belgique. La société Boehringer Ingelheim a quant à elle commercialisé un vaccin trivalent constitué de souches inactivées de *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes* et *T. sarkisovii*, enregistré en Belgique sous le nom d'Insol Trichophyton®. Aucune étude indépendante n'a permis de confirmer l'efficacité de ce vaccin et il n'est d'ailleurs plus commercialisé en Belgique.

En République tchèque, plusieurs vaccins, non adjuvantés, contenant des souches atténuées ou inactivées de différentes espèces de dermatophytes ont été commercialisés par la firme Bioveta. Parmi eux, deux vaccins ont été développés contre la teigne bovine à *T. verrucosum*. L'un contient des microconidies vivantes de *T. verrucosum* (CCM8165) et est commercialisé sous le nom Trichoben®. L'autre est constitué de ces mêmes microconidies mais irradiées sous rayonnements UV (Trichoben AV®). Cette société dispose également du vaccin Trichopelen® contenant une souche de *T. mentagrophytes* et indiqué pour l'immunisation des chinchillas, des lapins et des animaux à fourrure (Rybníkář *et al.*, 1998). Bioveta a également développé différents vaccins inactivés contre la teigne canine (Biocan M Plus®), la teigne féline (Biofel M Plus®) et la teigne équine (Trichoequen®). Peu d'informations sur ces vaccins sont disponibles dans la littérature ; de plus, ils ne sont disponibles que dans les pays de l'Est de l'Europe (<http://www.bioveta.cz/en/veterinary-division>). Aucune étude n'a été réalisée sur l'efficacité de ces vaccins et selon les indications fournies par Bioveta, ils peuvent être administrés aussi bien pour la prévention que pour le traitement des dermatophytoses. Selon les avis de certains praticiens vétérinaires ayant eu recours à ces vaccins, ceux-ci ne protègent pas contre l'infection et peuvent même induire une infection chronique s'ils sont administrés à des chats atteints de dermatophytose.

Un vaccin inactivé et adjuvanté, indiqué pour la prévention et le traitement de la teigne féline à *M. canis*, le Fel-O-Vax® MC-K (Fort Dodge) a été disponible pendant plusieurs années, notamment aux Etats-Unis, mais sa commercialisation est maintenant arrêtée. Des études ont démontré que ce vaccin semblait peu efficace (DeBoer *et al.*, 2002) et pouvait

même aggraver les symptômes lorsqu'il était administré à des chats déjà atteints de dermatophytose (Scott *et al.*, 2001).

En Belgique, un vaccin inactivé à base de huit souches de dermatophytes ayant pour cible les animaux de compagnie a été commercialisé sous le nom d'Insol Dermatophyton[®] (Boehringer Ingelheim). L'efficacité de ce vaccin n'a jamais été prouvée de manière adéquate et il a été retiré du marché belge. Un nouveau vaccin pentavalent, inactivé et non adjuvanté a été développé par cette même société. Son efficacité dans le traitement des dermatophytoses félines a été évaluée récemment par Westhoff et collaborateurs (2010) qui ont montré que ce vaccin permettait d'accélérer la guérison de manière significative chez les jeunes chats ainsi que chez les chats infectés pour la première fois.

En conclusion, il n'existe plus de vaccins disponibles en Belgique contre les dermatophytoses et le seul vaccin dont l'efficacité a formellement été prouvée est le Bovilis[®] Ringvac destiné aux bovins. De plus, aucun vaccin efficace contre la dermatophytose chez les carnivores domestiques n'a à ce jour été commercialisé. C'est pourquoi, des recherches visant à identifier et caractériser des antigènes immunogènes sont nécessaires pour pouvoir *in fine* mettre sur le marché un vaccin efficace. La mise au point d'un tel vaccin répondrait à un marché économique important, notamment dans le cas de la dermatophytose à *M. canis* qui touche un grand nombre d'élevage de chats en Belgique ainsi que dans les autres pays industrialisés dans lesquels l'animal de compagnie occupe une place de plus en plus importante au sein de la société.

3.2. Les vaccins expérimentaux

Les vaccins atténués sont plus efficaces que les vaccins inactivés mais le risque de réversion qu'ils présentent constitue un désavantage (Lund et Deboer, 2008). C'est pourquoi l'utilisation de vaccins sous-unitaires, composés de molécules ou d'un ensemble de molécules provenant d'un organisme, semble plus sûre. Deux vaccins sous-unitaires non adjuvantés à base de la protéine hsp60 de *T. mentagrophytes*, l'un sous forme de protéine recombinante l'autre sous forme d'ADN ont été testés chez le veau et le cobaye (Milan *et al.*, 2004). Les résultats ont montré que les deux vaccins n'induisaient qu'une protection partielle, le vaccin à base d'ADN étant cependant plus efficace que le vaccin contenant la protéine recombinante. Une autre équipe a également démontré que des extraits ribosomiaux de *M. canis* et de *T. verrucosum* utilisés respectivement pour vacciner des cobayes (Elad et Segal, 1994) et des bovins (Elad et Segal, 1995) ont permis de réduire significativement la durée de l'infection et ont induit une réponse à médiation cellulaire ainsi qu'une réponse en anticorps. Les adjuvants

utilisés pour ces deux études étaient l'hydroxyde d'aluminium et le N-Acetylmuramyl-L-alanyl-D-isoglutamine qui favorisent la production d'anticorps.

Pier et collaborateurs (1995) ont démontré que la vaccination avec un vaccin adjuvanté, contenant 4 souches différentes de dermatophytes (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. equinum* et *T. mentagrophytes*) inactivées, permettait de protéger des cobayes contre une infection à *M. canis*. Dans cet essai vaccinal, l'épreuve d'infection a été réalisée en introduisant chez les cobayes vaccinés et les cobayes contrôles, un individu infecté par *M. canis*. Cette technique est plus représentative d'une infection naturelle. Cependant, il n'est pas spécifié dans cette étude si le groupe servant de contrôle avait reçu l'adjuvant ou non. L'effet protecteur observé chez les cobayes vaccinés pourrait donc être dû à l'adjuvant seul plutôt qu'au pouvoir immunogène de l'antigène contenu dans le vaccin.

Chez le chat, les premiers essais de vaccination contre *M. canis* ont été réalisés en utilisant un vaccin non adjuvanté contenant un extrait brut de paroi fongique administré par voie intradermique. Les animaux vaccinés ont ensuite été infectés par inoculation (DeBoer et Moriello, 1994) ou par contact direct avec un chat infecté (DeBoer et Moriello, 1995b). La vaccination a induit une réponse en anticorps comparable, mais une réponse immune à médiation cellulaire inférieure à celle observée lors d'une infection naturelle. Tous les chats, vaccinés ou non, ont développé des lésions de dermatophytose.

Au laboratoire de Mycologie vétérinaire de l'Université de Liège, des essais vaccinaux ont été réalisés à l'aide d'antigènes caractérisés en utilisant le cobaye comme modèle expérimental. L'immunogénicité de l'exoantigène, de rSub3 et de rMep3 a été évaluée. Le protocole expérimental comportait trois immunisations à 15 jours d'intervalle suivies d'une épreuve d'infection 42 à 48 jours après la dernière vaccination. Les antigènes utilisés étaient couplés à l'adjuvant de Freund complet ou incomplet selon qu'il s'agisse de la première immunisation ou des deux suivantes. Les résultats ont montré que les antigènes utilisés induisaient une réponse en anticorps élevée et une réponse cellulaire transitoire. Néanmoins, ceux-ci n'ont pas conféré de protection chez les cobayes vaccinés (Descamps *et al.*, 2003b ; Vermout *et al.*, 2004).

Les résultats des recherches expérimentales portant sur la mise au point d'un vaccin efficace contre la dermatophytose ne sont donc pas très concluants. Des études ont démontré que certains antigènes conféraient une protection aux animaux vaccinés (Elad et Segal, 1994 ; Elad et Segal, 1995 ; Pier *et al.*, 1995), cependant ces résultats découlent d'études anciennes dans lesquelles les tests statistiques, permettant d'analyser de manière objective les données, n'étaient pas réalisés. Ces échecs de vaccination peuvent être liés d'une part au manque de

caractérisation d'antigènes immunogènes, à un protocole d'infection expérimentale inadapté ou encore à un choix d'adjuvant inapproprié. Lors d'essais de vaccination, le choix d'un adjuvant adéquat est primordial (Vermout *et al.*, 2003). Lors d'une dermatophytose, la réponse immune protectrice est une réponse à médiation cellulaire (Almeida, 2008 ; Mignon *et al.*, 2008 ; Vermout *et al.*, 2008b) qui résulterait de l'activation de la voie Th1 et de la production d'IFN- γ (Lund *et al.*, 2001). Dès lors, l'utilisation d'adjuvants tels le monophosphoryl-lipid-A (MPLA) ou les oligonucléotides CpG favorisant l'induction d'une réponse immune de type Th1 (Vermout *et al.*, 2003) permettrait peut-être une meilleure stimulation du système immunitaire et renforcerait les propriétés immunogènes de l'antigène testé.

4. Les modèles expérimentaux de dermatophytose

Seuls les modèles expérimentaux *in vivo* sont décrits dans ce paragraphe.

De nombreux modèles animaux ont été utilisés pour étudier les dermatophytoses chez l'homme (Shimamura *et al.*, 2012). Parmi eux, le cobaye est le modèle animal le plus utilisé (Saunte *et al.*, 2008). La majorité des études utilisant un modèle animal de dermatophytose concerne l'évaluation des propriétés des molécules antifongiques. Très peu d'études ont été consacrées à l'immunité anti-dermatophytes et à la pathogenèse des dermatophytoses. Le cobaye a été utilisé pour évaluer certains facteurs de virulence du dermatophyte zoophile *A. benhamiae* (Staib *et al.*, 2010 ; Grumbt *et al.*, 2011). Dans notre laboratoire, le cobaye a été utilisé pour étudier l'implication de la protéase recombinante Sub3 dans la pathogenèse de l'infection à *M. canis* (Baldo *et al.*, 2010). Les propriétés immunogéniques de l'exoantigène ainsi que des antigènes caractérisés Sub3 et Mep3 de *M. canis* ont également été évaluées sur ce même modèle animal (Mignon *et al.*, 1999b ; Descamps *et al.*, 2003b, Vermout *et al.*, 2004). Le cobaye est un bon modèle animal car les lésions de dermatophytose développées lors de l'infection expérimentale sont identiques à celles observées au cours d'une infection naturelle et guérissent spontanément. Cependant, il existe peu d'outils génétiques et immunologiques disponibles chez cette espèce. De plus, son coût et le caractère non consanguin de cette espèce, responsable de l'importante hétérogénéité des lésions cliniques observées entre individus, prônent pour l'utilisation d'un modèle murin de dermatophytose.

De manière surprenante, les modèles de dermatophytoses utilisant la souris sont quasi inexistants. Un ancien modèle de dermatophytose à *Trichophyton quinckeanum** a été décrit chez la souris (Hay *et al.*, 1983 ; Hay *et al.*, 1988). Grâce à ce modèle, ces auteurs ont mis en évidence une infiltration rapide de PMN sur le lieu d'infection et la formation de masses

composées de filaments mycéliens dans l'épiderme. Cependant, la pertinence de ce modèle est discutable car *T. quinckeanum* est responsable d'une forme particulière de dermatophytose, le favus, rarement rencontrée chez l'homme et l'animal (Beguin *et al.*, 2012). Plus récemment, deux autres modèles utilisant des dermatophytes chez la souris ont été décrits, mais ils ne sont pas représentatifs d'une infection naturelle superficielle (Nakamura *et al.*, 2012 ; Venturini *et al.*, 2012). A l'heure actuelle, il n'existe donc aucun modèle murin représentatif d'une infection naturelle superficielle permettant d'évaluer la réponse immune induite au cours d'une dermatophytose.

* : *Trichophyton quinckeanum* est apparenté au dermatophyte anthropophile *T. schoenleinii* et provoque chez la souris des lésions de dermatophytose particulières appelées « favus ». Ces lésions sont caractérisées par des plaques croûteuses et la formation d'un godet favique de quelques millimètres centré sur un poil (*T. quinckeanum*) ou un cheveu (*T. schoenleinii*). La fusion de plusieurs godets forme une croûte favique.

CHAPITRE 2

Objectifs

Ce travail s'inscrit dans le contexte général de l'étude des mécanismes impliqués dans l'établissement d'une réponse immune protectrice au cours d'une dermatophytose et plus spécifiquement lors d'une dermatophytose à *M. canis* chez le chat.

La réponse immune anti-dermatophytes demeure peu explorée (Almeida, 2008 ; Mignon *et al.*, 2008) et l'élargissement des connaissances sur le sujet permettrait *in fine* de mettre au point un vaccin efficace contre la dermatophytose chez les carnivores domestiques. A l'heure actuelle, en Belgique, aucun vaccin anti-dermatophytes n'est commercialisé. De plus, pour la majorité d'entre eux, leur efficacité n'a jamais été démontrée de manière rigoureuse (Lund et Deboer, 2008). Les lacunes concernant les mécanismes impliqués dans l'établissement de l'immunité anti-dermatophytes et l'absence de vaccin efficace disponible sur le marché résultent notamment du manque de modèles murins de dermatophytose représentatifs d'une infection superficielle naturelle.

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) pourraient être impliqués dans la mise en place d'une réponse immune protectrice au cours d'une dermatophytose. En effet, les PMN sont les cellules effectrices responsables *in fine* de l'élimination de l'infection via la phagocytose, la production d'ions superoxydes et de peptides antimicrobiens, et la formation du NET (*neutrophil extracellular trap*) (Calderon et Hay, 1987 ; Dahl, 1994 ; Heddergott *et al.*, 2012). De plus, le rôle des PMN dans l'établissement de l'immunité adaptative antifongique a déjà été démontré dans un modèle *in vitro* de candidose orale. Au cours d'une telle infection, ils sont attirés sur le site d'infection et libèrent des cytokines telles le GM-CSF, le TNF- α , l'IL-1 α , l'IL-1 β et l'IL-8 capables d'orienter la réponse immune vers la voie Th1 (Schaller *et al.*, 2004). Les objectifs de la première étude nous permettant de vérifier cette hypothèse consistent à évaluer *in vitro* le rôle des PMN félins dans l'établissement de la réponse immune au cours d'une dermatophytose à *M. canis*.

Un constituant sécrété de *M. canis*, nommé surnageant non induit (SNI) produit des DTH (*delayed type hypersensitivity*) chez le cobaye guéri d'une infection expérimentale (Tabart, 2008), ce qui suggère qu'il contient des antigènes potentiellement intéressants pour le développement d'un vaccin. Cette hypothèse sera vérifiée dans la deuxième étude dont le but est d'évaluer les propriétés protectrices du SNI, couplé à l'adjuvant monophosphoryl-lipid-A (MPLA), un agoniste du TLR (*toll like receptor*)-4, dans un essai vaccinal utilisant le cobaye comme modèle expérimental. Le choix de l'adjuvant MPLA repose sur sa capacité à favoriser la mise en place d'une réponse immune cellulaire de type Th1 (Vermout *et al.*, 2003) qui est considérée comme protectrice au cours d'une dermatophytose.

Enfin, étant donné le manque de modèles murins représentatifs d'une infection naturelle superficielle et permettant l'étude en profondeur de la pathogenèse des dermatophytoses grâce à l'utilisation d'outils génétiques et immunologiques variés disponibles chez la souris, l'objectif de la troisième étude est de mettre au point un modèle murin de dermatophytose permettant d'étudier *in vivo* la réponse immune générée au cours de l'infection.

CHAPITRE 3

Présentation synoptique des résultats

1. ETUDE 1 : Rôle des polymorphonucléaires neutrophiles félines dans la mise en place de la réponse immune au cours d'une dermatophytose à *Microsporum canis*

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) félines produisent des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β et IL-8) lorsqu'ils sont stimulés par les arthrospores vivantes de *M. canis* ainsi que par des constituants structuraux (arthrospores tuées par la chaleur) et sécrétés. En outre, les taux d'ARNm des récepteurs de type toll TLR-2 et TLR-4 sont augmentés dans les PMN félines exposés aux arthrospores vivantes et tuées ainsi qu'aux protéases sécrétées Sub3 et Sub6 de *M. canis*. Ces résultats suggèrent que les PMN félines ont un rôle dans la mise en place de la réponse immune au cours d'une dermatophytose à *M. canis* en produisant des cytokines pro-inflammatoires et que les récepteurs TLR-2 et TLR-4 pourraient être responsables de leur activation.

2. ETUDE 2 : Evaluation des propriétés protectrices d'un constituant sécrété de *Microsporum canis* couplé à l'adjuvant monophosphoryl lipid-A dans un essai vaccinal en utilisant le cobaye comme modèle expérimental

Le composant sécrété de *M. canis*, produisant des réactions cutanées d'hypersensibilité de type retardé (*delayed type hypersensitivity*, DTH) chez le cobaye immunisé après une primo-infection, ne semble pas protéger ce dernier d'une infection expérimentale à *M. canis* avec le protocole de vaccination utilisé. En revanche, l'adjuvant monophosphoryl lipid-A (MPLA), à lui seul, a un effet protecteur partiel chez les cobayes soumis à une épreuve d'infection par *M. canis*. Cette étude montre également une importante variation interindividuelle dans les résultats obtenus, ce qui suggère de développer un nouveau modèle animal utilisant la souris pour l'étude de la réponse immune anti-dermatophytes.

3. ETUDE 3 : Evaluation de la réponse immune cutanée au cours d'une dermatophytose à *Arthroderma benhamiae* et *Arthroderma vanbreuseghemii* en utilisant un modèle murin expérimental

Le modèle murin mis au point dans cette étude est valide et reproductible en utilisant les dermatophytes *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii*. Les souris infectées par les deux dermatophytes développent des symptômes cutanés typiques de dermatophytose. Les deux dermatophytes induisent également des lésions inflammatoires et colonisent les structures

kératinisées de l'épiderme et des follicules pileux. De plus, le recrutement important de PMN dans la peau des souris infectées par les deux dermatophytes et le profil cytokinique généré par l'infection (TGF- β , IL-1 β , IL-6 et IL-22) suggère que la voie Th17 pourrait être impliquée dans la mise en place de la réponse immune anti-dermatophytes.

CHAPITRE 4

Section expérimentale

**Rôle des polymorphonucléaires neutrophiles félines dans la mise en
place de la réponse immune au cours d'une dermatophytose à
*Microsporum canis***

Préambule

Les PMN sont les premiers leucocytes recrutés sur le site d'infection et pourraient donc contribuer à l'établissement d'une réponse immune protectrice au cours d'une dermatophytose à *M. canis*. En effet, leur rôle dans l'induction de l'immunité innée et de l'immunité adaptative a déjà été démontré pour d'autres infections fongiques (Brakhage *et al.*, 2010 ; Brown, 2011).

Pour évaluer le rôle des PMN félines au cours d'une infection à *M. canis*, nous avons tout d'abord mesuré le taux de certaines cytokines produites par ces cellules lorsqu'elles sont stimulées par des arthrospores vivantes ainsi que par différents constituants structuraux et sécrétés du champignon.

La production de cytokines par les PMN faisant suite à une reconnaissance entre les PRR exprimés par ces cellules et les PAMP de *M. canis*, nous avons ensuite évalué le taux des TLR-2, TLR-4 et de la dectine-1 exprimé dans les PMN stimulés par divers constituants fongiques. Dans d'autres maladies fongiques, il a été démontré que ces récepteurs sont exprimés par les PMN et sont impliqués dans la reconnaissance des PAMP fongiques (Bellocchio *et al.*, 2004b ; Weindl *et al.*, 2007 ; Bonfim *et al.*, 2009).

Cette étude comprend deux parties. La majorité des résultats obtenus dans la première partie, intitulée « *Feline polymorphonuclear neutrophils produce pro-inflammatory cytokines following exposure to Microsporum canis* », ont été publiés dans le journal *Veterinary Microbiology* en 2013. Quelques résultats obtenus dans le cadre de cette première partie n'ont pas été publiés et sont décrits en annexe (« Evaluation de la production de cytokines par les PMN félines stimulés par Sub6 de *M. canis* »). L'ensemble constitue l'étude 1-1.

La seconde partie, intitulée « Taux d'ARNm des PRR exprimés dans les PMN félines stimulés par différents PAMP de *M. canis* », n'a pas été publiée. Elle est rédigée en français et présentée sous forme d'un article scientifique (étude 1-2).

Etude 1-Partie 1

Feline polymorphonuclear neutrophils produce pro-inflammatory cytokines following exposure to *Microsporium canis*

Veterinary Microbiology (2013), 162, 800-5

Ludivine Cambier, Anne Mathy, Aline Baldo, Elena Tatiana Bagut, Jérémy Tabart,
Nadine Antoine, Bernard Mignon

Abstract

The mechanisms involved in the establishment of the specific immune response against dermatophytes remain unknown. Polymorphonuclear neutrophils (PMNs) are recruited early during the infection process and participate in the elimination of dermatophytes. They could therefore be involved in the induction of the immune response during dermatophytoses by producing specific cytokines. The aim of this work was to assess the *in vitro* cytokine production by feline PMNs exposed to living arthroconidia from the dermatophyte species *Microsporum canis* or stimulated with either a secreted or a structural component of *M. canis*, the latter consisting of heat-killed arthroconidia. The levels of specific cytokines produced by PMNs was determined by capture ELISA and/or quantitative RT-PCR. Results showed that PMNs secrete TNF α , IL-1 β and IL-8 following exposure to *M. canis* living arthroconidia and stimulation with both a secreted component and heat-killed arthroconidia. The level of IL-8 mRNA was also increased in PMNs stimulated with *M. canis* living arthroconidia. In conclusion, infective *M. canis* arthroconidia induce the production of pro-inflammatory cytokines by feline PMNs that can be activated either by secreted or structural fungal components. Our results suggest that these granulocytes are involved in the initiation of the immune response against *M. canis*.

Introduction

Microsporum canis is a zoonotic dermatophyte responsible for most ringworm in dogs and cats (Weitzman and Summerbell, 1995; Chermette et al., 2008; Mignon and Monod, 2011). Because dermatophytes invade hard keratinized skin structures, considerable attention has focused on the characterization of secreted proteases as putative fungal virulence factors (Monod, 2008; Vermout et al., 2008), but few of them have been demonstrated to be pathogenic factors in *M. canis* (Descamps et al., 2002; Baldo et al., 2010; Bagut et al., 2012). In contrast, little effort has been devoted to the study of the host immune response against *M. canis* specifically and other dermatophytes in general (Almeida, 2008; Mignon et al., 2008). Despite their superficial localization in skin, dermatophytes can induce an adaptive immune response. The cellular response, which is associated with delayed type hypersensitivity (DTH), is known to be correlated with clinical recovery and protection against re-infection (Calderon, 1989; Almeida, 2008; Mignon et al., 2008). The first immunological events following the infection are yet to be elucidated, including the role of innate immunity in the set-up of the host-specific immune response. The first epidermal cells encountered by dermatophytes during the infection process are keratinocytes, which can produce a broad spectrum of cytokines upon exposure to these fungi (Nakamura et al., 2002; Shiraki et al., 2006; Tani et al., 2007), including the chemo-attractant for polymorphonuclear neutrophils (PMNs) IL-8 and the pro-inflammatory TNF α (Nakamura, 2002). The first leucocytes recruited to the site of infection in dermatophytoses are PMNs (Hay et al., 1988). These cells, along with macrophages, are known to be responsible for the elimination of dermatophytes (Calderon and Hay, 1987; Heddergott et al., 2012). Their potential role in the induction of the specific immune response in dermatophytoses remains unknown but can be reasonably hypothesized. Indeed, in other fungal and microbial infections PMNs can initiate and modulate the adaptive immune response by interacting with dendritic cells and producing specific cytokines (Schaller et al., 2004; Megiovanni et al., 2006; Charmoy et al., 2010). The aim of this study was to evaluate the potential role of feline PMNs during the early stages of *M. canis* infection. To this purpose, PMNs were cultured with various *M. canis* components and the levels of specific cytokines produced by PMNs were assessed.

Material and Methods

Isolation of feline polymorphonuclear neutrophils

Blood from cats was kindly provided by veterinarian practitioners through blood donations taken with the agreement of the cats' owners. Sampled cats were domestic short-haired intact

male or female young adults with no history of medical problems. The clinical examination revealed no abnormalities. Cats were negative after testing for infection with Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus using the WITNESS[®] FeLV-FIV test (Prodivet, Eynatten, Belgium). Fungal cultures performed from cat hair were negative for dermatophytes.

Feline PMNs were isolated from heparinized whole blood samples using Polymorphprep[™] solution (Axis-Shield, Oslo, Norway). Blood was layered over the density gradient and centrifuged for 30 min at 500 g. Two distinct leukocyte layers (lymphocytes and monocytes in the upper and granulocytes in the lower layer) were obtained. PMNs were harvested, washed and suspended in 24-well cell culture plates (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) at a concentration of 1×10^6 /ml in RPMI 1640 + GlutaMAX[™] medium (Gibco, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, Life Technologies). Hemacolor[®] staining (Merck, Whitehouse station, NJ, USA) was performed to ensure the purity (PMN>95%) of isolated cells. The latter were vital-stained using the trypan blue dye-exclusion method, and the number of living leukocytes (>98%) was assessed using a Neubauer chamber. Freshly isolated PMNs were used in all experiments.

Production of *Microporum canis* arthroconidia

Arthroconidia were produced from the *M. canis* strain IHEM 21239 by a process previously outlined (Tabart et al., 2007). Briefly, arthroconidia were obtained from 15-day-old cultures on 2% yeast extract/1% peptone agar (VWR Scientific Products, San Dimas, CA, USA) in an atmosphere containing 12% CO₂ at 30°C. Surface mycelium and conidia were scraped, transferred to PBS and filtered through Miracloth layers (22-25 µm; Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Arthroconidia concentration was determined by serial dilutions on Sabouraud's dextrose agar (Sab) medium. Arthroconidia were stored at 4°C until use. In all experiments, arthroconidia were used within 1 month.

To exclude a possible contamination with an endotoxin (LPS) during arthroconidia production, a PBS solution was prepared using the same procedure except that arthroconidia were omitted. This control PBS solution was further used concomitantly in PMN stimulation experiments (cf. below).

Production of *Microsporium canis* secreted and structural components

In addition to living arthroconidia, two components were produced to further stimulate feline PMNs: a secreted component and heat-killed arthroconidia representing structural components.

The secreted component was obtained after growing *M. canis* arthroconidia (1×10^5) in 500 ml liquid Sab medium for 5 days at 28°C under gentle agitation. Culture supernatant was separated from fungal elements by centrifugation, concentrated by ultrafiltration on an Amicon (Millipore, Billerica, MA, USA) 10 kDa membrane and stored at -20°C until use. Protein concentrations were determined by Bradford's method (Bradford, 1976).

The structural components were obtained by heating *M. canis* arthroconidia (1×10^5) at 95°C for 10 min. Arthroconidia were cooled down to room temperature and directly used in stimulation experiments. Killing of arthroconidia was confirmed by the absence of growth on Sab medium plates incubated at 27°C for 21 days.

Exposure of feline PMNs to *Microsporium canis*

Feline PMNs (1×10^6 /well) were stimulated for 24 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ (i) with *M. canis* living arthroconidia (1×10^5 /well) or with culture medium alone as negative control; (ii) with 10 µg of the secreted component or with liquid Sab medium as negative control; (iii) with 1×10^5 /well heat-killed arthroconidia or with PBS as negative control. A positive control consisting in stimulation of PMNs with 1 µg lipopolysaccharide (LPS)/well (purified from *Escherichia coli*; 0111:B4, Sigma-Aldrich) was also performed. All experiments were performed in triplicate using PMNs from three unrelated cats.

Quantification of cytokine secretion by feline PMNs

After *M. canis* exposure, PMN culture supernatants were collected by centrifugation for 5 min at 500 g, filtered (0.2 µm) and stored at -80°C after being shock-frozen in liquid nitrogen. The amount of TNFα, IL-1β, IL-8 and IFNγ secreted in culture supernatants was measured by capture ELISA using a DuoSet[®] kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) according to the manufacturer's protocol. The concentration of each cytokine was determined using a standard curve generated by 2-fold serial dilutions of the recombinant cytokine. Absorbance values were measured at 450 nm using a Multiskan RC spectrophotometer (ThermoLabsystems, Altrincham, Cheshire, UK).

Quantification of cytokine mRNA level in feline PMNs

PMNs total RNA was isolated using a High Pure RNA Isolation kit (Roche Applied Sciences, Lewes, East Sussex, UK) following the manufacturer's instructions. Template cDNA was synthesized from RNA by reverse transcription, using iScript™ cDNA Synthesis kit (Bio-rad, Hercules, CA, USA). Reverse transcriptase was omitted in control reactions. Oligonucleotides were selected using the Primer-BLAST program

(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd). The sequences of oligonucleotide primers for feline 18S rRNA (internal control), TNF α , IL-1 α , IL-8 and IL-18 were synthesized by Eurogentec (Liège, Belgium) (Table 1). The qPCR reactions were assembled using the iQ™ SYBR® Green Supermix (Bio-rad) and subjected to the following protocol in a MiniOpticon System (Bio-rad): 10 min at 95°C and 40 cycles of 45 s at 95°C, 45 s at 60°C and 45 s at 72°C. The melting curve was performed from 45°C to 95°C in 1°C/15 s increments. The number of copies of each mRNA was evaluated using a standard curve generated by serial dilutions of cDNA standard samples (from 10 to 1 × 10⁹) using the Thermal cycler software (Bio-rad). Each transcript level was normalized to that of 18S rRNA from the corresponding sample.

Statistical analysis

The amount of secreted cytokines and the level of cytokine mRNA in PMNs exposed to *M. canis* components were compared with those determined in corresponding negative control PMNs.

Significant differences between two data sets were assessed using a general linear model (GLM procedure of SAS; SAS Institute Inc., Cary, NC, U.S.A.) with significance defined as $P < 0.05$.

Table 1. Sequences of oligonucleotide primers

Target gene	Forward sense (5'→3')	Reverse sense (5'→3')
18S rRNA	CGGCTACCACATCCAAGGA	GCTGGAATTACCGCGGCT
TNF α	CTTCTCGAACTCCGAGTGACAAG	CCACTGGAGTTGCCCTTCA
IL-1 α	CAAATCAGTTGCCCATCCAAA	TGTGCCTGGACCCCAAGCAA
IL-8	ACACCAGACCCACACTGCA	TCTGAAAGTCAGTGACAGAGGGTAG
IL-18	GGAGATCAACCTGTGTTTGAGGAT	GATGGTTACTGCCAGACCTCTAGTG

Results

PMNs produce TNF α , IL-1 β and IL-8 following exposure to *Microsporium canis* living arthroconidia

The amount of TNF α , IL-1 β , IL-8 and IFN γ secreted by PMNs co-cultured with living arthroconidia was evaluated by capture ELISA. Stimulated PMNs produced significantly more TNF α (2.5-fold), IL-1 β (8-fold) and IL-8 (25-fold) in culture supernatant than non-stimulated PMNs, whereas IFN γ secretion was not affected by stimulation (Fig. 1). The cytokine response evaluated by ELISA was actually induced by arthroconidia and not by a possible contamination with an endotoxin (LPS). Indeed, the cytokine production of PMNs stimulated with the control PBS solution did not differ from that of non-stimulated PMNs (data not shown).

Cytokine mRNA levels in PMNs exposed to *M. canis* living arthroconidia were evaluated by qRT-PCR and compared with those in non-stimulated PMNs (Fig. 2). In response to arthroconidia stimulation, the level of IL-8 mRNA expressed by PMNs increased significantly (35-fold). A slight increase of TNF α mRNA level was also observed; nevertheless, this result was not significant. A slight and non-significant decrease of IL-18 mRNA level was even observed in stimulated PMNs. The level of IL-1 α mRNA expression in stimulated and non-stimulated PMNs was similar.

A secreted and a structural component from *Microsporium canis* are potent stimulators of PMNs

To investigate which *M. canis* components were responsible for pro-inflammatory cytokine production by PMNs stimulated with living arthroconidia, cells were exposed to either secreted, represented by the secreted component (or liquid Sab medium as specific negative control) or structural, represented by heat-killed arthroconidia (or PBS as specific negative control) fungal components. A positive control consisting of stimulation of PMNs with LPS was also performed.

Figure 3 shows the concentrations of TNF α , IL-1 β and IL-8 in culture supernatants of PMNs exposed to the secreted component and heat-killed arthroconidia. As feline PMNs stimulated with *M. canis* living arthroconidia did not produce IFN γ (Fig. 1), the presence of this cytokine was not further tested. As expected, LPS induced a significant increase of TNF α (4.5-fold), IL-1 β (4.8-fold) and IL-8 (10-fold) production in PMNs culture supernatant. A significant increase of TNF α (5-fold), IL-1 β (11-fold) and IL-8 (2-fold) production was observed upon stimulation with heat-killed arthroconidia. These structural components

induced a similar (TNF α) and even a higher (IL-1 β) cytokine production than LPS. Feline PMNs stimulated with the secreted component produced significantly more TNF α (3.3-fold), IL-1 β (3-fold) and IL-8 (2-fold) than PMNs stimulated with liquid Sab medium.

Cytokine mRNA levels in PMNs exposed to the secreted component and heat-killed arthroconidia are shown in Figure 4. A significant increase of TNF α (4-fold) and IL-8 (14-fold) mRNA levels was observed in PMNs stimulated with LPS. Unexpectedly, LPS did not induce a significant increase of IL-1 α and IL-18 mRNA expression in PMNs. Cytokine mRNA levels were similar in PMNs stimulated with heat-killed arthroconidia and PBS. A non-significant increase of IL-1 α , IL-8 and IL-18 mRNA expression in PMNs stimulated with the secreted component was observed.

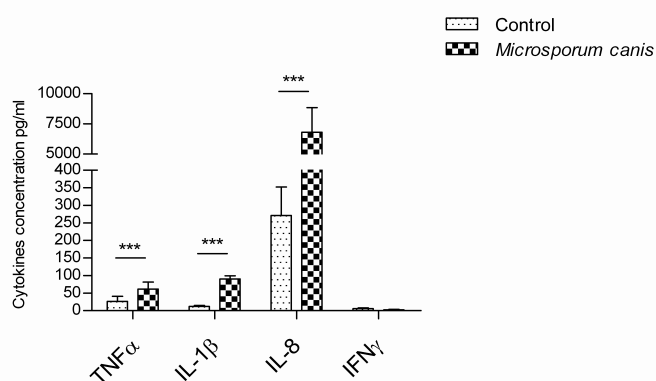


Fig. 1. *Microsporium canis* living arthroconidia induce pro-inflammatory cytokines secretion by feline polymorphonuclear neutrophils (PMNs).

Feline PMNs were cultured in the absence (control) or the presence of *M. canis* arthroconidia for 24 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The amount of TNF α , IL-1 β , IL-8 and IFN γ secreted in culture supernatant was evaluated by capture ELISA. In response to *M. canis* arthroconidia stimulation, PMNs produce significantly more ($P < 0.001$) TNF α , IL-1 β and IL-8 in culture supernatant while IFN γ secretion is not affected by stimulation. Data are representative of 3 independent experiments (mean \pm SEM).

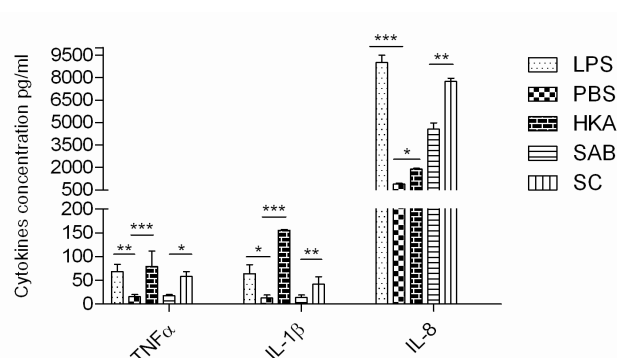


Fig. 3. Feline polymorphonuclear neutrophils (PMNs) secrete pro-inflammatory cytokines in response to a secreted component (SC) and heat-killed arthroconidia (HKA) from *Microsporium canis*. PMNs were stimulated for 24 h with either lipopolysaccharide (LPS, positive control) or *M. canis* HKA (or PBS as specific negative control) or *M. canis* SC (or liquid Sab medium as specific negative control) and the amount of TNF α , IL-1 β and IL-8 secreted in culture supernatant was evaluated by capture ELISA. A significant increase in TNF α , IL-1 β and IL-8 secretion by PMNs was observed in culture supernatant of PMNs stimulated with LPS, SC and HKA, indicating that both secreted and structural components from *M. canis* are able to stimulate PMNs. Data are representative of 3 independent experiments (mean \pm SEM). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

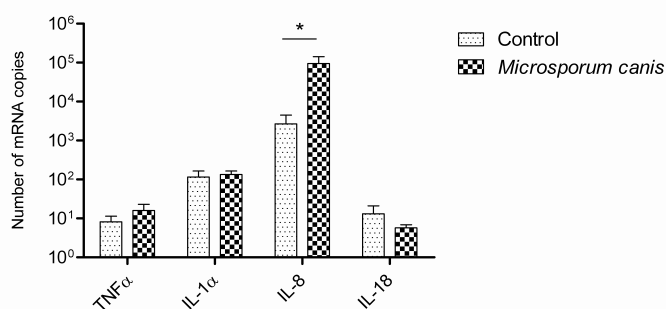


Fig. 2. *Microsporium canis* living arthroconidia induce an increase of IL-8 mRNA expression in feline polymorphonuclear neutrophils (PMNs). Feline PMNs were cultured in the absence (control) or the presence of *M. canis* arthroconidia for 24 h at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. The levels of TNF α , IL-1 α , IL-8 and IL-18 mRNA were quantified by qRT-PCR and the number of mRNA copies was evaluated using a standard curve. In response to *M. canis* arthroconidia stimulation, only IL-8 mRNA expression increases significantly in PMNs (* $P < 0.05$). Data are representative of 3 independent experiments (mean \pm SEM).

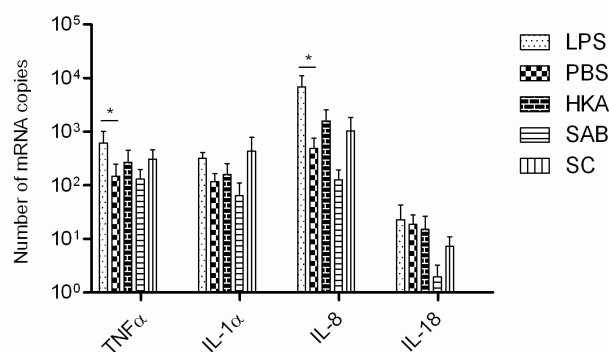


Fig. 4. The cytokine mRNA expression in feline polymorphonuclear neutrophils (PMNs) does not vary in response to a secreted component (SC) and heat-killed arthroconidia (HKA) from *Microsporium canis*. PMNs were stimulated for 24 h with either lipopolysaccharide (LPS, positive control) or *M. canis* HKA (or PBS as specific negative control) or *M. canis* SC (or liquid Sab medium as specific negative control). The levels of TNF α , IL-1 α , IL-8 and IL-18 mRNA were quantified by qRT-PCR and the number of mRNA copies was evaluated using a standard curve. No significant modification in the cytokine mRNA expression by PMNs was observed except an increase of TNF α and IL-8 mRNA level upon LPS stimulation (* $P < 0.05$). Data are representative of 3 independent experiments (mean \pm SEM).

Discussion

Results obtained by ELISA show that, in response to *M. canis* living arthroconidia stimulation, feline PMNs secrete TNF α , IL-1 β and IL-8, which are three pro-inflammatory cytokines. It has been suggested that PMNs play a role in protection by producing pro-inflammatory cytokines in other fungal infections. In an *in vitro* model of oral candidosis, the addition of human PMNs to epithelium induces the production of IL-1 α , IL-1 β , TNF α and IL-8 (Schaller et al., 2004). In response to *Paracoccidioides brasiliensis*, a fungus responsible for systemic mycoses, PMNs produce IL-8 (Acorci-Valério et al., 2010). This cytokine is a potent chemotactic factor for PMNs, promoting degranulation in these cells and enhancing their antifungal activity (Djeu et al., 1990). In our experimental conditions no IFN γ secretion from feline PMNs stimulated with *M. canis* arthroconidia was observed. This is not surprising because the main IFN γ -producing cells are T lymphocytes (Rengarajan et al., 2000). The pro-inflammatory cytokines produced by feline PMNs exposed to the infective spores of *M. canis*, namely arthroconidia, indicate that these cells may recruit and activate other immune cells

like dendritic cells, macrophages and PMNs themselves. Further studies are needed to understand more precisely how PMNs can interact with other immune cells and to verify their role in the set-up of the specific immune response against *M. canis*.

Results obtained by qRT-PCR show that in response to *M. canis* living arthroconidia stimulation, the mRNA levels of cytokines do not vary in PMNs, except for an upregulation of IL-8. The considerable release of TNF α detected by ELISA is not correlated to the level of mRNA expression. This result is surprising but similar observations have been reported in other studies (Sawant and McMurray, 2007; Saegusa et al., 2009). This is not related to the inability of PMNs to modulate their gene expression in response to environmental changes. Indeed, in our study, the TNF α mRNA expression increases significantly in PMNs stimulated with LPS (Fig. 4). Additionally, other studies have reported the regulation of gene expression in PMNs stimulated with pathogens (Fradin et al., 2007; Ma et al., 2011). The discrepancy between ELISA and qRT-PCR results concerning TNF α detection could be related to either the short half-life of PMNs in culture or most probably, the few RNA they contain due to their high content of dense chromatin (Dockrell et al., 2007). More specifically, the amount of isolated mRNA could be insufficient to detect a low but potentially significant increase in TNF α transcript despite the high sensitivity of the commercial kits. According to our results, ELISA rather than qRT-PCR seems to be more appropriate for quantification of PMN feline cytokines.

We have demonstrated that feline PMNs produce pro-inflammatory cytokines upon exposure to *M. canis* living arthroconidia. To further investigate which fungal components could be responsible for this activation, a secreted and a structural component consisting of heat-killed arthroconidia were produced and used for stimulation experiments. They were shown to induce the release of TNF α , IL-1 β and IL-8, suggesting that both secreted and structural *M. canis* components are involved in the activation of feline PMNs. Regarding structural components, Saegusa et al. (2009) reported similar results with heat-killed *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* that induce TNF α , IL-1 β and IL-8 production by human PMNs. Additionally, zymosan, a glucan prepared from a yeast cell wall and LPS, a component of the outer membrane of Gram-negative bacteria, are commonly used to stimulate the production of cytokines by PMNs (Bellocchio et al., 2004). The role of specific secreted components in the activation of PMNs has also been demonstrated for other pathogenic microbes, namely, *C. albicans* (Losse et al., 2011) and *Trichomonas vaginalis* (Nam et al., 2012). Interestingly, in addition to containing strong activators of feline PMNs, the secreted component induces DTH in immune guinea pigs having spontaneously recovered from an

experimental infection with *M. canis* (Mignon, personal communication). This indicates that the secreted component should contain Th1 antigens. Consequently, the characterization and the selection of appropriate protective antigens from the secreted component appear to be of major importance in the development of an effective vaccine against *M. canis*.

In our experiments, feline PMNs and *M. canis* components are in close contact. PMNs are able to capture PAMPs (pathogen associated molecular patterns) of the fungus via their PRRs (pattern recognition receptors). Among PRRs expressed by PMNs, TLRs (toll like receptors) are well characterized in humans and mice but not in cats. In human PMNs, the TLR-2 and TLR-4 are involved in the recognition of fungal PAMPs and therefore contribute to the establishment of a protective immune response (Bellocchio et al., 2004; Acorci-Valério et al., 2010). These TLRs could also be involved in the recognition of *M. canis* PAMPs and consequently induce TNF α , IL-1 β and IL-8 secretion by feline PMNs. The characterization of these receptors would be very helpful in furthering our understanding of the mechanisms involved in the first steps of the establishment of immunity against *M. canis*.

Conflict of interest statement

None.

Acknowledgements

This study was supported by grant 3.4558.10 299 from Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (FRSM). A.M was and L.C. is, the recipient of a studentship from FRIA (Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture, 1000 Brussels, Belgium). E.T.B. is the recipient of a research grant provided by the University of Liège. The authors thank Dr L. Massart for statistical analysis.

References

- Acorci-Valério, M.J., Bordon-Graciani, A.P., Dias-Melicio, L.A., De Assis Golim, M., Nakaira-Takahagi, E., De Campos Soares, Â.M.V., 2010. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scan. J. Immunol.* 71, 99-108.
- Almeida, S.R., 2008. Immunology of Dermatophytosis. *Mycopathologia* 166, 277-283.
- Bagut, E. T., Baldo, A., Mathy, A., Cambier, L., Antoine, N., Cozma, V., Mignon, B., 2012. Subtilisin Sub3 is involved in adherence of *Microsporum canis* to human and animal epidermis. *Vet. Microb.* In press.
- Baldo, A., Mathy, A., Tabart, J., Camponova, P., Vermout, S., Massart, L., Marechal, F., Galleni, M., Mignon, B., 2010. Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporum canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. *Br. j. Dermatol.* 162, 990-997.
- Bellocchio, S., Moretti, S., Perruccio, K., Fallarino, F., Bozza, S., Montagnoli, C., Mosci, P., Lipford, G.B., Pitzurra, L., Romani, L., 2004. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J. Immunol.* 173, 7406-7415.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- Calderon, R.A., Hay, R.J., 1987. Fungicidal activity of human neutrophils and monocytes on dermatophyte fungi, *Trichophyton quinckeanum* and *Trichophyton rubrum*. *Immunology* 61, 289-295.
- Calderon, R.A., 1989. Immunoregulation of dermatophytosis. *Critical reviews in microbiology* 16, 339-368.
- Charmoy, M., Brunner-Agten, S., Aebischer, D., Auderset, F., Launois, P., Milon, G., Proudfoot, A.E.I., Tacchini-Cottier, F., 2010. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog.* 6, e1000755.
- Chermette, R., Ferreiro, L., Guillot, J., 2008. Dermatophytoses in animals. *Mycopathologia* 166, 385-405.
- Descamps, F., Brouta, F., Monod, M., Zaugg, C., Baar, D., Losson, B., Mignon, B., 2002. Isolation of a *Microsporum canis* gene family encoding three subtilisin-like proteases expressed in vivo. *J. Invest. Dermatol.* 119, 830-835.

- Djeu, J.Y., Matsushima, K., Oppenheim, J.J., Shiotsuki, K., Blanchard, D.K., 1990. Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/IL-8. *J. Immunol.* 144, 2205-2210.
- Dockrell, D.H., McGrath, E.E., Whyte, M.K., Sabroe, I., 2007. The neutrophil. In: Brown, G.D., Netea, M.G. (Eds.), *Immunology of fungal infections*, Springer, The Netherlands, pp. 51-73.
- Fradin, C., Mavor, A.L., Weindl, G., Schaller, M., Hanke, K., Kaufmann, S.H.E., Mollenkopf, H., Hube, B., 2007. The early transcriptional response of human granulocytes to infection with *Candida albicans* is not essential for killing but reflects cellular communications. *Infect. Immun.* 75, 1493-1501.
- Hay, R.J., Calderon, R.A., Mackenzie, C.D., 1988. Experimental dermatophytosis in mice: correlation between light and electron microscopic changes in primary, secondary and chronic infections. *Br. J. Exp. Pathol.* 69, 703-716.
- Heddergott, C., Bruns, S., Nietzsche, S., Leonhardt, I., Kurzai, O., Kniemeyer, O., Brakhage, A.A., 2012. The *Arthroderma benhamiae* hydrophobin HypA mediates hydrophobicity and influences recognition by human immune effector cells. *Eukaryot. Cell* 11, 673-682.
- Losse, J., Svobodová, E., Heyken, A., Hube, B., Zipfel, P.F., Józsi, M., 2011. Role of pH-regulated antigen 1 of *Candida albicans* in the fungal recognition and antifungal response of human neutrophils. *Mol. Immunol.* 48, 2135-2143.
- Ma, Z., Wang, Y., Zhu, X., Zhang, C., Li, S., Jin, L., Shen, Y., Haapasalo, M., 2011. Role of polymorphonuclear neutrophils in the clearance of *Enterococcus faecalis* derived from saliva and infected root canals. *J. Endod.* 37, 346-352.
- Megiovanni, A.M., Sanchez, F., Robledo-Sarmiento, M., Morel, C., Gluckman, J.C., Boudaly, S., 2006. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: A new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.* 79, 977-988.
- Mignon, B., Monod, M., 2011. Zoonotic infections with dermatophyte fungi. In: Palmer, S.R., Soulsby, E.J., Torgerson, P.R., Brown, D.W.G. (Eds.), *Zoonoses*, Oxford University Press, Oxford, pp. 838-849.
- Mignon, B., Tabart, J., Baldo, A., Mathy, A., Losson, B., Vermout, S., 2008. Immunization and dermatophytes. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 134-140.
- Monod, M., 2008. Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia* 166, 285-294.

- Nakamura, Y., Kano, R., Hasegawa, A., Watanabe, S., 2002. Interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha production in human epidermal keratinocytes induced by *Trichophyton mentagrophytes*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 9, 935-937.
- Nam, Y.H., Min, A., Kim, S.H., Lee, Y.A., Kim, K.A., Song, K.J., Shin, M.H., 2012. Leukotriene B 4 receptors BLT1 and BLT2 are involved in interleukin-8 production in human neutrophils induced by *Trichomonas vaginalis*-derived secretory products. Inflamm. Res., 1-6.
- Rengarajan, J., Szabo, S.J., Glimcher, L.H., 2000. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. Immunol. Today 21, 479-483.
- Saegusa, S., Totsuka, M., Kaminogawa, S., Hosoi, T., 2009. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* stimulate cytokine secretion from human neutrophil-like HL-60 cells differentiated with retinoic acid or dimethylsulfoxide. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73, 2600-2608.
- Sawant, K.V., McMurray, D.N., 2007. Guinea pig neutrophils infected with *Mycobacterium tuberculosis* produce cytokines which activate alveolar macrophages in noncontact cultures. Infect. Immun. 75, 1870-1877.
- Schaller, M., Boeld, U., Oberbauer, S., Hamm, G., Hube, B., Korting, H.C., 2004. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis. Microbiology 150, 2807-2813.
- Shiraki, Y., Ishibashi, Y., Hiruma, M., Nishikawa, A., Ikeda, S., 2006. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. J. Med. Microb. 55, 1175-1185.
- Tabart, J., Baldo, A., Vermout, S., Nusgens, B., Lapiere, C., Losson, B., Mignon, B., 2007. Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for *Microsporum canis* dermatophytosis. J. Med. Microbiol. 56, 971-975.
- Tani, K., Adachi, M., Nakamura, Y., Kano, R., Makimura, K., Hasegawa, A., Kanda, N., Watanabe, S., 2007. The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes. Arch. Dermatol. Res. 299, 381-387.
- Vermout, S., Tabart, J., Baldo, A., Mathy, A., Losson, B., Mignon, B., 2008. Pathogenesis of dermatophytosis. Mycopathologia 166, 267-275.
- Weitzman, I., Summerbell, R.C., 1995. The dermatophytes. Clin. Microbiol. Rev. 8, 240-259.

Etude 1-Partie 2

**Taux d'ARNm des PRR exprimés dans les PMN félines
stimulés par différents PAMP de *M. canis***

Résumé

Les mécanismes impliqués dans la mise en place d'une réponse immune protectrice au cours d'une dermatophytose à *M. canis* demeurent peu connus. Nous avons démontré que les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) jouent un rôle dans l'immunité anti-*M. canis* en produisant des cytokines pro-inflammatoires telles le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-8 lorsqu'ils sont stimulés par différents constituants fongiques structuraux et sécrétés. Cette production cytokinique est la conséquence de la reconnaissance d'un PAMP (*pathogen associated molecular pattern*) de *M. canis* par un PRR (*pattern recognition receptor*) du PMN. Parmi les PRR qu'ils expriment, le TLR (*toll like receptor*)-2, TLR-4 et la dectine-1 des PMN sont impliqués dans la reconnaissance de nombreux PAMP fongiques. Le but de cette étude était d'évaluer l'expression des taux d'ARNm du TLR-2, du TLR-4 et de la dectine-1 dans les PMN félines stimulés par différents constituants structuraux et sécrétés de *M. canis*, à savoir, des arthrospores vivantes et tuées, les protéases sécrétées de type subtilisine Sub3 et Sub6, et un composant sécrété nommé surnageant non induit (SNI). Les résultats ont montré que les taux d'ARNm des TLR-2 et TLR-4 étaient augmentés dans les PMN stimulés par les arthrospores vivantes et tuées ainsi que par Sub3 et Sub6, indiquant que ces constituants fongiques pourraient être impliqués dans la reconnaissance de ces récepteurs. Le SNI n'a pas induit d'augmentation du taux d'expression de ces récepteurs, ce qui suggère que la production de cytokines pro-inflammatoires qu'il induit dans les PMN félines fait intervenir d'autres PRR.

Introduction

Microsporum canis est un dermatophyte kératinophile et kératinolytique responsable d'une infection superficielle cutanée appelée dermatophytose ou plus communément « teigne » (Chermette *et al.*, 2008). Son hôte naturel est le chat, mais il est également susceptible d'infecter d'autres espèces animales comme le chien et il est responsable d'une zoonose dont l'incidence est en constante augmentation dans les pays industrialisés (Seebacher *et al.*, 2008). Les chats développant une réponse immune efficace protectrice contre cette infection, le développement d'un vaccin constitue une solution très intéressante pour combattre les dermatophytoses. Cependant, il n'existe plus, à l'heure actuelle, de vaccins contre la dermatophytose commercialisés en Belgique. De plus, leur efficacité n'a jamais été formellement prouvée (Lund et Deboer, 2008). De nombreux auteurs ont conclu que ces échecs étaient le reflet d'un manque de connaissances de la réponse immune anti-*M. canis* (DeBoer et Moriello, 1995 ; Descamps *et al.*, 2003b ; Vermout *et al.*, 2004 ; Mignon *et al.*, 2008). La réponse immune protectrice générée au cours d'une dermatophytose est une réponse à médiation cellulaire et impliquerait les lymphocytes de type Th1 (Calderon et Hay, 1984 ; Almeida, 2008 ; Mignon *et al.*, 2008). Cependant, les mécanismes impliqués dans l'établissement d'une réponse immune protectrice sont loin d'être élucidés. Nous avons démontré dans la première partie de cette étude que les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) félines, sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires telles le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-8 lorsqu'ils sont stimulés par des arthrospores vivantes de *M. canis* ainsi que par des constituants fongiques tant sécrétés que structuraux (Cambier *et al.*, 2013). Cette production de cytokines pro-inflammatoires est induite suite à la reconnaissance d'un PAMP (*pathogen associated molecular pattern*) fongique par un PRR (*pattern recognition receptor*) cellulaire. La nature des PAMP et des PRR impliqués est primordiale pour l'orientation de la réponse immune et déterminante pour la résolution de l'infection. Ainsi, les récepteurs de type toll (*toll like receptor*, TLR) TLR-2 et TLR-4 sont deux PRR impliqués dans la reconnaissance de PAMP fongiques (van de Veerdonk *et al.*, 2008 ; Bonfim *et al.*, 2009 ; Li *et al.*, 2009). Le TLR-4 reconnaît également le lipopolysaccharide (LPS), un composant de la paroi cellulaire des bactéries Gram négatif (Kumagai *et al.*, 2008). D'autres PRR tels que le DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin*) et les dectines-1 et 2 qui sont tous les trois des lectines de type C interviennent également dans la reconnaissance des PAMP fongiques (Sato *et al.*, 2006). Ces récepteurs, et plus particulièrement le TLR-2, le TLR-4 et la dectine-1, pourraient également être impliqués dans

la reconnaissance des PAMP de *M. canis*. En effet, chez l'homme, l'expression de ces trois récepteurs est modifiée dans les PMN stimulés par *Paracoccidioides brasiliensis*, un champignon responsable de mycose endémique en Amérique latine (Bonfim *et al.*, 2009).

Le but de cette étude est d'évaluer l'expression des TLR-2, TLR-4 et dectine-1 par les PMN félines stimulés par différents constituants structuraux et sécrétés de *M. canis*.

Matériels et méthodes

Isolement des polymorphonucléaires neutrophiles félines

Les PMN ont été isolés par centrifugation sur gradient de densité à partir de sang de chat prélevé dans le cadre de dons de sang. Cinq millilitres de sang hépariné ont été mélangés stérilement à un volume égal d'une solution à base de dextran (Polymorphprep[®], Axis-Shield, Oslo, Norvège) et centrifugés à 500 g pendant 30 minutes sans frein. Après centrifugation, deux anneaux cellulaires étaient visibles, le deuxième en partant du haut contenant les PMN. Ceux-ci ont été récoltés dans du milieu de culture : RPMI 1640 + GlutaMAX (Gibco, Life Technologies, Paisley, Ecosse) et centrifugés à 400 g pendant 5 minutes. Le culot a été resuspendu dans 1 ml de milieu de culture et les cellules vivantes ont été dénombrées à l'aide d'un hématimètre de Neubauer après coloration au bleu de trypan. Les cellules présentes dans l'anneau, à raison de 1×10^4 cellules par 100 μ l ont été déposées par cyto-centrifugation sur lames de verre pour microscopie. Les lames ont été colorées à l'aide d'un kit Hémacolor[®] (Merck Chemicals, France) pour juger de la pureté cellulaire. Les PMN ont ensuite été cultivés dans du milieu de culture supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé par la chaleur, en atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ et à 37°C.

Production des arthrospores de *M. canis*

Les arthrospores de *M. canis* ont été produites à partir de la souche IHEM 21239 selon une technique décrite précédemment au laboratoire. Le champignon a été cultivé pendant 15 jours sur milieu de Sabouraud solide à 27°C puis récolté avec une lame de scalpel stérile et mis en culture sur un milieu YEN (*yeast extract nitrogen*). Le mycélium, dans des conditions particulières de culture associant de faibles sources de nutriments et une forte concentration en CO₂, peut former des spores de résistance, éléments *in vitro* proches des arthroconidies produites *in vivo*. Après incubation pendant 21 jours à 30°C dans une atmosphère humide et

sous 12 % de CO₂, le champignon a été récolté au moyen d'une lame de scalpel stérile et resuspendu dans de l'eau distillée stérile. La suspension cellulaire a été agitée pendant une nuit à 4°C pour permettre la séparation des spores des hyphes. Les arthrospores ont ensuite été séparées des filaments mycéliens par filtration sur tissu Miracloth® (Merck Chemicals, Nottingham, United Kingdom). Le filtrat contenant les arthrospores a été centrifugé à 4500 g et le culot a été lavé 3 fois dans de l'eau distillée stérile. La densité cellulaire de la suspension a été déterminée par dénombrement des unités formant colonies (UFC) sur milieu de Sabouraud après une incubation de 48 heures à 27°C. La suspension a également été cultivée à 37°C pendant 24 heures sur des milieux favorisant la croissance de micro-organismes afin de vérifier l'absence de contamination.

Production des composés structuraux et sécrétés fongiques

Les composés structuraux ont été obtenus en inactivant les arthrospores par la chaleur à 95°C pendant 10 minutes. Les arthrospores tuées ont ensuite été refroidies à température ambiante et une partie a étéensemencée sur milieu de Sabouraud pour vérifier qu'aucune colonie fongique ne se développait après 21 jours de culture à 27°C.

Les composés sécrétés utilisés dans cette étude étaient : le surnageant non induit (SNI), la protéase recombinante de type subtilisine (Sub)3 et la protéase recombinante Sub6. Le SNI a été produit à partir des arthrospores de *M. canis* selon une technique développée au laboratoire (Tabart, 2008). Brièvement, les arthrospores (1×10^5) ont été cultivées dans du milieu de Sabouraud liquide pendant 72 heures sous agitation puis le surnageant de culture a été récupéré, filtré et concentré 10 fois sur une membrane de 10 kDa, puis dialysé à deux reprises contre du PBS pendant 2 heures à 4°C. La protéase Sub3 a été produite sous forme recombinante dans la levure *Pichia pastoris* et purifiée selon une méthode mise au point au laboratoire (Descamps *et al.*, 2003a). La protéase Sub6 a également été produite sous forme recombinante dans la levure *P. pastoris* puis purifiée, en présence de PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), comme précédemment décrit (Mathy, 2012). Le SNI ainsi que les deux protéases ont été conservés à -20°C jusqu'à utilisation et leur concentration a été déterminée par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

Exposition des PMN félins aux divers constituants fongiques

Les PMN félins (1×10^6 /puits) ont été stimulés pendant 2 heures ou 4 heures à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ avec les arthrospores vivantes (1×10^5 /puits) de *M. canis* (ou du PBS comme contrôle négatif spécifique) ou les différents constituants fongiques à savoir : les arthrospores tuées par la chaleur (1×10^5 /puits) (ou du PBS comme contrôle négatif spécifique), 10 µg de SNI (ou du Sabouraud liquide comme témoin négatif spécifique), 10 µg de rSub3 (ou du PBS comme témoin négatif spécifique) et 10 µg de rSub6 (ou du tampon Tris/HCl comme témoin négatif spécifique). Les PMN ont également été stimulés avec 10 µg de lipopolysaccharide (LPS) et 10 µg de zymosan comme contrôles positifs. Toutes les expériences ont été réalisées trois fois à partir de cellules provenant de trois chats différents.

Quantification du taux d'expression d'ARNm du TLR-2, TLR-4 et dectine-1 dans les PMN félins

Après stimulation pendant 2 heures ou 4 heures, les PMN ont été récoltés, centrifugés et les culots cellulaires ont été resuspendus dans 750 µL de TRIzol[®] Reagent (Invitrogen, Carlsbad, Etats-Unis), plongés une minute dans l'azote liquide puis conservés à -80°C jusqu'à utilisation. Toutes les étapes de purification d'ARN total ont été réalisées à 4°C. Brièvement, les culots cellulaires resuspendus dans le TRIzol ont été décongelés sur glace et du chloroforme (200 µL/mL de TRIzol) a été ajouté aux échantillons pour séparer l'ARN des autres constituants cellulaires. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 12000 g pendant 15 minutes. La phase aqueuse contenant l'ARN a été récupérée et de l'isopropanol (500 µL/mL de TRIzol) a été utilisé pour permettre la précipitation de l'ARN. Après centrifugation à 12000 g pendant 10 minutes, le culot d'ARN a été lavé avec de l'éthanol 75 % (1 mL/1 mL de TRIzol) et resuspendu dans 30 µL d'eau *RNAse free*. Les échantillons d'ARN ont été traités avec de la DNase (Invitrogen) et directement transformés en ADN complémentaire (ADNc) à l'aide du kit *iScript cDNA Synthesis*[®] (Biorad, Hercules, California, Etats-Unis). Un témoin sans *reverse transcriptase* et un témoin sans échantillon ont également été réalisés.

Les ADNc du TLR-2, du TLR-4, de la dectine-1 et de deux référents, l'ARN ribosomal 18S et la GAPDH ont été amplifiés par PCR quantitative à l'aide du kit *iQ SYBR Green Supermix*[®] (Biorad). Les conditions de PCR utilisées étaient les suivantes :

dénaturation à 95°C pendant 10 minutes suivie de 40 cycles à 95°C pendant 45 secondes, 60°C pendant 45 secondes et 72°C pendant 45 secondes. La courbe de fusion a été réalisée de 45°C jusqu'à 95°C en augmentant de 0,5°C toutes les 10 secondes. Les amorces utilisées ont été (GAPDH, TLR-2, TLR-4) publiées antérieurement (Ignacio *et al.*, 2005), ou (ARNr 18S, dectine-1) sélectionnées en utilisant le programme *PrimerBlast*. Les amorces suivantes ont été synthétisées par Eurogentec (Verviers, Belgique) :

F-5'CGGCTACCACATCCAAGGA3', R-5'GCTGGAATTACCGCGGCT3' (ARNr 18S) ;
 F-5'TCAGCTCTCAAGGCGTCAC3', R-5'GCATAGGATTCCCAAGGTCA3' (dectine-1) ;
 F-5'GCCGTGGAATTTGCCGT3', R-5'GCCATCAATGACCCCTTCAT3' (GAPDH) ;
 F-5'AGACTCTACCAGATGCCTCCTTCT3', R-5'GCGTGAAAGACAGGAATTCACAGG3'
 (TLR-2) ; F-5'GCTGGCAATTCTTTCCAGGACAAC3', R-5'TCTGGAGGGAGTGAAGA-
 GGTTTCAT3' (TLR-4). Les produits de PCR ont été migrés sur un gel d'agarose 3 % afin de vérifier la taille des produits PCR obtenus par rapport aux produits PCR attendus (Figure 1).

Analyses statistiques

Les taux d'ARNm des récepteurs TLR-2, TLR-4 et dectine-1 exprimés par les PMN félins exposés aux différents constituants fongiques ont été comparés à ceux déterminés dans les PMN exposés aux contrôles négatifs correspondants. Les différences significatives entre deux groupes ont été évaluées en utilisant un modèle linéaire généralisé (*general linear model*, GLM procedure of SAS; SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, Etats-Unis) avec un seuil de signification statistique $P < 0,05$.

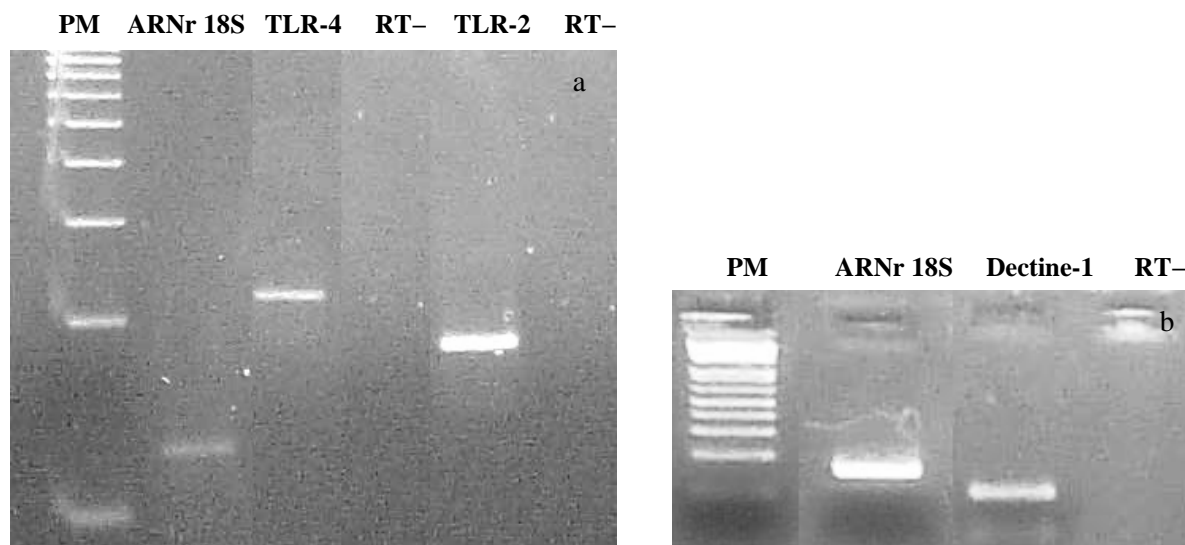


Figure 1. Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMN) félines expriment les récepteurs TLR (*toll like receptor*)-2, TLR-4 et dectine-1.

Les PMN félines ont été stimulés par divers constituants de *Microsporium canis* et l'ARN total a été isolé des cellules puis transformé en ADNc. Une RT-PCR quantitative a été réalisée et les produits obtenus ont été séparés par migration sur un gel d'agarose 3 %. Ce gel démontre que les PMN félines expriment du TLR-2 et du TLR-4 (a) ainsi que de la dectine-1 (b).

PM : poids moléculaire ; RT- : échantillon d'ARN non soumis à la *reverse transcriptase*

Résultats

Les taux d'ARNm des récepteurs TLR-2, TLR-4 et dectine-1 ont été évalués par RT-PCR quantitative dans les PMN félines stimulés par les différents constituants de *M. canis* pendant 2 heures ou 4 heures. Les résultats obtenus ont été analysés par la méthode de Livak aussi connue sous le nom de $\Delta\Delta Cq$. Pour chaque échantillon mesuré, les valeurs obtenues ont été corrigées par la moyenne géométrique des deux références internes, l'ARNr 18S et la GAPDH. Ensuite les taux d'ARNm mesurés dans les PMN stimulés ont été exprimés par rapport à ceux mesurés dans les PMN exposés aux contrôles négatifs correspondants. Les résultats ont donc été exprimés sous forme d'unités relatives, le taux basal étant arbitrairement fixé à 1.

Les taux d'ARNm du TLR-2, TLR-4 et dectine-1 sont représentés dans la figure 2. Après 2 heures de stimulation, le taux d'ARNm du TLR-2 était augmenté de manière significative dans les PMN stimulés par les arthrospores vivantes, les arthrospores tuées et

rSub6. Après 4 heures de stimulation, en réponse à ces mêmes constituants, le taux d'ARNm du TLR-2 était encore augmenté de manière significative dans les PMN mais de manière moins importante. En revanche, rSub3 a induit une augmentation significative et forte du taux d'ARNm du TLR-2 dans les PMN après 4 heures de stimulation. Après 2 heures ou 4 heures de stimulation, le SNI n'a pas induit de modification significative du taux d'ARNm du TLR-2 dans les PMN. Des résultats similaires ont été observés pour l'expression du taux d'ARNm du TLR-4 dans les PMN félines, excepté pour les arthrospores vivantes qui ont induit une augmentation significative uniquement après 4 heures de stimulation. Le taux d'ARNm de la dectine-1 dans les PMN n'a pas été modifié de manière significative après stimulation par les différents constituants fongiques. De manière surprenante, le LPS et le zymosan, utilisés comme contrôles positifs respectivement du TLR-4 et du TLR-2, n'ont pas induit d'importantes modifications significatives dans les PMN. Le LPS a induit une augmentation significative du taux d'ARNm du TLR-2 après 2 heures de stimulation et du taux du TLR-4 après 4 heures de stimulation. Une diminution du taux d'ARNm de la dectine-1 a même été observée dans les PMN stimulés par le LPS 2 heures après stimulation. Après stimulation par le zymosan, aucune modification significative n'a été observée dans les PMN.

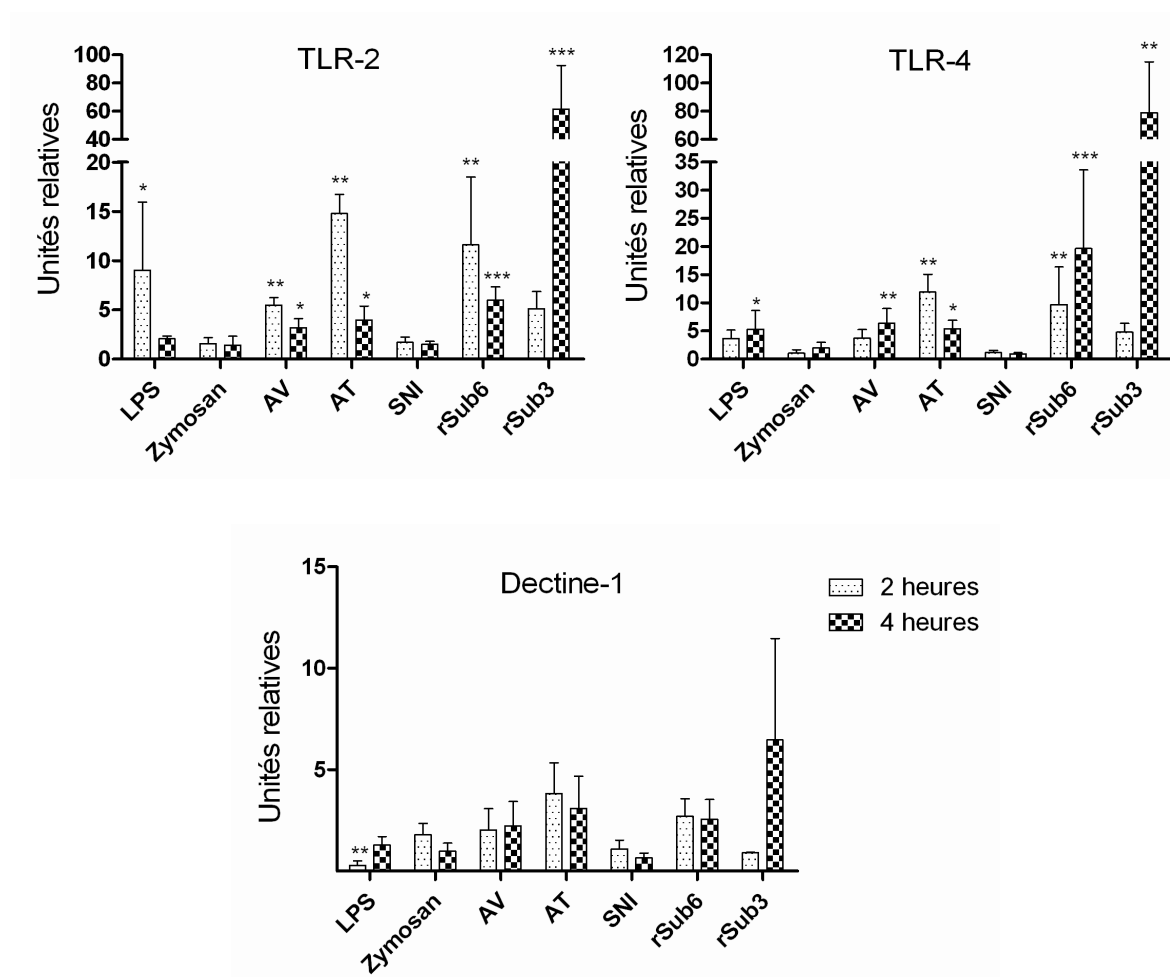


Figure 2. Taux d'ARNm des TLR-2, TLR-4 et dectine-1 exprimés dans les PMN félines. Les polymorphonucléaires (PMN) félines ont été stimulés pendant 2 heures ou 4 heures avec des arthrospores vivantes (AV), des arthrospores tuées par la chaleur (AT), du surnageant non induit (SNI), la protéase recombinante Sub6 et rSub3 de *Microsporium canis*. Les cellules ont également été stimulées par du lipopolysaccharide (LPS) et du zymosan comme contrôles positifs. Les taux d'ARNm des récepteurs TLR-2, TLR-4 et dectine-1 exprimés dans les PMN ont été évalués par RT-PCR quantitative et sont exprimés en unités relatives par rapport au taux basal fixé à 1. Ces données sont représentatives de 3 expériences indépendantes (moyenne \pm SEM). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

Discussion

Le but de cette étude était de déterminer quels récepteurs étaient impliqués dans l'activation des PMN félins lors d'une infection à *M. canis*. Nous nous sommes intéressés spécifiquement aux TLR-2, TLR-4 et dectine-1 car ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance de nombreux PAMP fongiques (Balloy *et al.*, 2005 ; Weindl *et al.*, 2007 ; Bonfim *et al.*, 2009 ; Skrzypek *et al.*, 2009 ; Acorci-Valério *et al.*, 2010 ; Saijo et Iwakura, 2011).

Bien qu'il ait été démontré que d'autres cellules félines expriment des TLR (Ignacio *et al.*, 2005 ; Franchini *et al.*, 2010), aucune étude précédente n'avait encore mis en évidence l'expression des récepteurs TLR-2, TLR-4 et dectine-1 dans des PMN félins. Nous avons également démontré que les taux d'ARNm du TLR-2 et TLR-4 augmentent dans les PMN stimulés par les arthrospores vivantes, tuées, rSub6 et rSub3 de *M. canis*. Ces résultats coïncident avec ceux obtenus par Bellochio et collaborateurs (2004) qui ont démontré que, chez l'homme, le taux d'expression en TLR-2 et TLR-4 augmente dans les PMN lorsqu'ils sont stimulés par des conidies d'*Aspergillus fumigatus*. Une autre étude a également démontré, en utilisant un modèle d'épiderme humain reconstruit, que la réponse immune générée au cours d'une infection à *Candida albicans* implique le TLR-4 et que ce mécanisme est dépendant des PMN (Weindl *et al.*, 2007). Une équipe de chercheurs travaillant sur les infections provoquées par *P. brasiliensis* chez l'homme a démontré que le taux d'expression du TLR-2 exprimé par les PMN augmente lorsque ceux-ci sont stimulés par le champignon sous forme de levure (Acorci-Valério *et al.*, 2010). Une autre étude a également démontré l'implication du TLR-2 mais également de la dectine-1 dans la reconnaissance de *P. brasiliensis* (Bonfim *et al.*, 2009). Nos résultats démontrent donc que le taux d'expression du TLR-2 et du TLR-4 augmente dans les PMN stimulés par des constituants structuraux et sécrétés de *M. canis*. Cependant, nous ne pouvons pas affirmer que ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance de ces constituants fongiques. D'autres expériences évaluant la production de cytokines pro-inflammatoires par les PMN après blocage des PRR sont nécessaires pour vérifier formellement l'implication de ces récepteurs. De plus, l'implication potentielle d'autres PRR dans la reconnaissance des PAMP de *M. canis* devrait être investiguée. En effet, bien qu'il induise la production de cytokines pro-inflammatoires par les PMN félins (Cambier *et al.*, 2013), le SNI de *M. canis* ne modifie pas le taux d'expression des TLR-2 et TLR-4 dans les PMN félins. D'autres récepteurs, comme le TLR-9, la dectine-2 ou

encore le DC-SIGN, impliqués dans la reconnaissance de PAMP d'autres agents pathogènes fongiques (Brown, 2011), pourraient intervenir au cours d'une dermatophytose à *M. canis*.

Les protéases recombinantes Sub3 et Sub6 de *M. canis* induisent une augmentation importante de l'expression du TLR-2 et du TLR-4 dans les PMN félines. Elles pourraient donc jouer un rôle important dans l'établissement de l'immunité anti-*M. canis*. Néanmoins, comme le montrent les résultats obtenus dans la première partie de cette étude, les PMN félines stimulés par rSub6 ne produisent pas de cytokines pro-inflammatoires, ce qui suggère que ces protéases pourraient être impliquées dans des mécanismes d'immuno-évasion. C'est le cas pour d'autres champignons qui sont capables d'interagir avec les PRR des leucocytes pour diminuer les activités antimicrobiennes de ces cellules ou échapper au système immunitaire (Netea *et al.*, 2007).

En conclusion, cette étude a permis tout d'abord de mettre en évidence que les PMN félines expriment les récepteurs TLR-2, TLR-4 et dectine-1 et que, parmi eux, les TLR-2 et 4 semblent impliqués dans la reconnaissance de PAMP de *M. canis*.

Références

ACORCI-VALÉRIO M.J., BORDON-GRACIANI A.P., DIAS-MELICIO L.A., DE ASSIS GOLIM M., NAKAIRA-TAKAHAGI E., DE CAMPOS SOARES Â.M.V. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scand. J. Immunol.*, 2010, **71**, 99-108.

ALMEIDA S.R. Immunology of Dermatophytosis. *Mycopathologia*, 2008, **166**, 277-283.

BALLOY V., SI-TAHAR M., TAKEUCHI O., PHILIPPE B., NAHORI M.A., TANGUY M., HUERRE M., AKIRA S., LATGE J.P., CHIGNARD M. Involvement of toll-like receptor 2 in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 5420-5425.

BELLOCCHIO S., MORETTI S., PERRUCCIO K., FALLARINO F., BOZZA S., MONTAGNOLI C., MOSCI P., LIPFORD G.B., PITZURRA L., ROMANI L. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J. Immunol.*, 2004, **173**, 7406-7415.

BONFIM C.V., MAMONI R.L., BLOTTA M.H.S.L. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.*, 2009, **47**, 722-733.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.

BROWN G.D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu. Rev. Immunol.*, 2011, **29**, 1-21.

CALDERON R.A., HAY R.J. Cell-mediated immunity in experimental murine dermatophytosis. II. Adoptive transfer of immunity to dermatophyte infection by lymphoid cells from donors with acute or chronic infections. *Immunology*, 1984, **53**, 465-472.

CAMBIER L., MATHY A., BALDO A., BAGUT E.T., TABART J., ANTOINE N., MIGNON B. Feline polymorphonuclear neutrophils produce pro-inflammatory cytokines following exposure to *Microsporum canis*. *Vet. Microbiol.*, 2013, **162**, 800-805.

CHERMETTE R., FERREIRO L., GUILLOT J. Dermatophytoses in animals. *Mycopathologia*, 2008, **166**, 385-405.

DEBOER D.J., MORIELLO K.A. Investigations of a killed dermatophyte cell-wall vaccine against infection with *Microsporum canis* in cats. *Res. Vet. Sci.*, 1995, **59**, 110-113.

DESCAMPS F., BROUTA F., VERMOUT S., MONOD M., LOSSON B., MIGNON B. Recombinant expression and antigenic properties of a 31.5-kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003a, **38**, 29-34.

DESCAMPS F.F., BROUTA F., VERMOUT S.M., WILLAME C., LOSSON B.J., MIGNON B.R. A recombinant 31.5 kDa keratinase and a crude exo-antigen from *Microsporum canis* fail to protect against a homologous experimental infection in guinea pigs. *Vet. Dermatol.*, 2003b, **14**, 305-312.

FRANCHINI M., ZINI E., OSTO M., JABLONSKI K., KAUFMANN K., LUTZ T.A., REUSCH C.E., ACKERMANN M. Feline pancreatic islet-like clusters and insulin producing cells express functional Toll-like receptors (TLRs). *Vet. Immunol Immunopathol.*, 2010, **138**, 70-78.

IGNACIO G., NORDONE S., HOWARD K.E., DEAN G.A. Toll-like receptor expression in feline lymphoid tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2005, **106**, 229-237.

KUMAGAI Y., TAKEUCHI O., AKIRA S. Pathogen recognition by innate receptors. *J. Infect. Chemother.*, 2008, **14**, 86-92.

LI M., CHEN Q., SHEN Y., LIU W. *Candida albicans* phospholipomannan triggers inflammatory responses of human keratinocytes through Toll-like receptor 2. *Exp. Dermatol.*, 2009, **18**, 603-610.

LUND A., DEBOER D.J. Immunoprophylaxis of dermatophytosis in animals. *Mycopathologia*, 2008, **166**, 407-424.

MATHY A. Contribution à l'étude du rôle des protéases de *Microsporum canis* dans les premières étapes du processus infectieux et caractérisation d'un nouveau facteur potentiel de virulence (PhD Thesis). Université de Liège: Liège, 2012, 183 p.

MIGNON B., TABART J., BALDO A., MATHY A., LOSSON B., VERMOUT S. Immunization and dermatophytes. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2008, **21**, 134-140.

NETEA M. G., VAN DER MEER J. W. M., J. K.B. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. In: Brown GD, Netea MG (Eds.), Immunology of fungal infections. Springer: New York, 2007, 259-272.

SAIJO S., IWAKURA Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int. Immunology*, 2011, **23**, 467-472.

SATO K., YANG X.L., YUDATE T., CHUNG J.S., WU J.M., LUBY-PHELPS K., KIMBERLY R.P., UNDERHILL D., CRUZ P.D., ARIIZUMI K. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 38854-38866.

SEEBACHER C., BOUCHARA J.P., MIGNON B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*, 2008, **166**, 335-352.

SKRZYPEK F., CENCI E., PIETRELLA D., RACHINI A., BISTONI F., VECCHIARELLI A. Dectin-1 is required for human dendritic cells to initiate immune response to *Candida albicans* through Syk activation. *Microbes Infect.*, 2009, **11**, 661-670.

TABART J. Contribution à l'étude du rôle des cellules épidermiques dans la mise en place de la réponse immune anti-*Microsporium canis* (PhD Thesis). Faculté de Médecine vétérinaire : Liège, 2008, 172 p.

VAN DE VEERDONK F.L., KULLBERG B.J., VAN DER MEER J.W., GOW N.A., NETEA M.G. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2008, **11**, 305-312.

VERMOUT S.M., BROUTA F.D., DESCAMPS F.F., LOSSON B.J., MIGNON B.R. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a *Microsporium canis* metalloprotease subunit vaccine in guinea pigs. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2004, **40**, 75-80.

WEINDL G., NAGLIK J.R., KAESLER S., BIEDERMANN T., HUBE B., KORTING H.C., SCHALLER M. Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. *J. Clin. Invest.*, 2007, **117**, 3664-3672.

Evaluation des propriétés protectrices d'un constituant sécrété de *Microsporium canis* couplé à l'adjuvant monophosphoryl lipid A dans un essai vaccinal en utilisant le cobaye comme modèle expérimental

*Assessment of immunogenicity and protective efficacy of a *Microsporium canis* secreted component coupled to monophosphoryl lipid A adjuvant in a vaccine trial using guinea pigs*

Préambule

Le traitement des dermatophytoses félines est particulièrement long, coûteux et est difficile à mettre en place. En effet, celui-ci implique l'utilisation de médicaments antifongiques locaux et systémiques, et doit être maintenu pendant au moins 5 semaines (Moriello, 2004). La teigne, malgré son taux quasi nul de morbidité, représente donc un problème majeur dans les chatteries dans lesquelles l'introduction d'un seul chat infecté asymptomatique suffit pour contaminer tous les autres animaux, générant, selon les individus, des chats infectés symptomatiques et d'autres asymptomatiques. C'est pourquoi, il serait utile de développer un vaccin efficace contre la dermatophytose chez le chat.

Deux essais vaccinaux ont déjà été réalisés chez le cobaye dans notre laboratoire en utilisant les protéases recombinantes Sub3 et Mep3 de *M. canis* ainsi que l'exoantigène qui correspond au surnageant de culture du champignon cultivé en milieu enrichi en kératine (Descamps *et al.*, 2003b ; Vermout *et al.*, 2004). Aucun effet protecteur n'a pu être démontré. Ces échecs peuvent être liés au manque de caractérisation d'antigènes immunogènes, à un protocole d'infection expérimentale inadapté ou encore à un choix d'adjuvant inapproprié.

Parmi les constituants fongiques de *M. canis*, le SNI représente un bon candidat vaccinal. En effet, il induit la production de cytokines pro-inflammatoires par les PMN félines (Cambier *et al.*, 2013) et produit des DTH chez le cobaye guéri d'une infection expérimentale (Tabart, 2008). Pour évaluer ses propriétés protectrices dans un essai vaccinal, il a été couplé à l'adjuvant MPLA qui est une forme détoxifiée du LPS. Le MPLA reconnaît spécifiquement le récepteur TLR-4 et favorise la mise en place d'une réponse immune cellulaire de type Th1 (Vermout *et al.*, 2003) qui est considérée comme protectrice au cours d'une dermatophytose.

Cette deuxième étude est présentée sous forme d'un article original qui sera soumis prochainement.

Assessment of immunogenicity and protective efficacy of a *Microsporium canis* secreted component coupled to monophosphoryl lipid-A adjuvant in a vaccine trial using guinea pigs

Article en préparation

Ludivine Cambier, Elena-Tatiana Bagut, Marie-Pierre Heinen, Nadine Antoine,
Bernard Mignon

Abstract

The aim of this work was to assess the immunogenicity and protective efficacy of a secreted component from *Microsporium canis* coupled to monophosphoryl lipid-A (MPLA) adjuvant, in a vaccine trial using the guinea pig as an experimental model. Animals were vaccinated subcutaneously with either the secreted component coupled to MPLA, the MPLA adjuvant alone or phosphate-buffered saline (PBS) three times at two-week intervals, until 42 days prior to *M. canis* infection challenge. A blind evaluation of dermatophytosis symptoms development and fungal persistence in skin was monitored weekly. The antibody response towards the secreted component was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay every 14 days throughout the entire experimental study, while the levels of interferon (IFN) γ and interleukin (IL)-4 expressed in peripheral blood mononuclear cells were evaluated by quantitative RT-PCR at the end of the experiment. The animals that received MPLA had significantly lower clinical signs than those that received PBS. However, no significant difference was observed between the guinea pigs vaccinated with the secreted component coupled to MPLA and those having received MPLA alone. The results also showed that vaccination induced a strong antibody response towards the secreted component and a slight increase in IFN γ and IL-4 mRNA levels. Our results suggest that the MPLA adjuvant used in this vaccine trial can be protective against a *M. canis* infection while the secreted component does not confer an additional protection under the present experimental conditions.

Introduction

Microsporum canis is a filamentous fungus that causes superficial mycoses in pet animals [1-3]. It is the main agent of dermatophytosis in cats, its natural host [4], and is responsible for a frequent zoonosis [5]. Feline dermatophytosis is particularly difficult, time-consuming and expensive to treat and thus represents a significant problem in animal husbandry [6]. Treatment of feline dermatophytosis, involving local and systemic antifungal medications and environmental decontamination, must be maintained for at least five weeks [7].

Immunoprophylaxis could represent an alternative to the control of animal dermatophytoses [8]. Several commercial and experimental vaccines against dermatophytosis have been developed. Their efficacy has been tested and the results were encouraging for some [9-12] while others did not confer any protection [13-15]. The single vaccine with well-demonstrated efficacy was the Bovilis[®] Ringvac (Intervet, the Netherlands) developed against bovine dermatophytosis. This vaccine, containing the *Trichophyton verrucosum* attenuated strain LFT-130, has dramatically reduced the prevalence of bovine ringworm and the incidence of human infections [16]. Experimental studies showed that this vaccine is protective and confers a long-lasting immunity, a booster vaccination, therefore, not being required [17]. In cats, several attempts have been made to develop vaccines using characterized antigens from *M. canis*. The protective efficacy of a crude exo-antigen and two recombinant proteases, the subtilisin rSub3 and the metalloprotease rMep3, used as immunogens, have been tested in a guinea pig experimental infection but the results were not conclusive [18, 19].

The development of safe and effective vaccines requires the use of both appropriate antigens and adjuvants. In dermatophytoses, the Th1 cellular immune response, associated with delayed-type hypersensitivity (DTH), appears to be correlated with clinical recovery and protection against reinfection [20-22]. Consequently, the use of adjuvants promoting the development of a Th1 immune response is of major importance in the set-up of an effective vaccine against dermatophytosis. The monophosphoryl lipid-A (MPLA) adjuvant, a toll-like receptor (TLR)-4 agonist, is able to promote a Th1 response [23] and could favour a protective immunity in dermatophytoses.

Recently, a secreted component from *M. canis* was shown to be a potent activator of feline polymorphonuclear neutrophils by inducing production of pro-inflammatory cytokines [24]. Additionally, this secreted component produced DTH in immune guinea pigs that had spontaneously recovered from a *M. canis* experimental infection (Mignon, personal

communication). The aim of this study was to assess the protective efficacy of this *M. canis* secreted component coupled to the MPLA adjuvant, using the guinea pig as an experimental infection model.

Materials and Methods

Animals

Eighteen pathogen-free three-month-old female guinea pigs of the Hartley strain (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) were used. Guinea pigs were housed in group cages in which vaccinated animals were separated from unvaccinated controls during the entire study. Animal experiments were approved by the local ethics committee (University of Liège, ethics protocol no. 1053).

Production of *M. canis* arthroconidia

Arthroconidia were produced from the *M. canis* strain IHEM 21239 (Institute of Hygiene and Epidemiology-Mycology, Brussels, Belgium) by a process previously described [25]. Briefly, arthroconidia were obtained from 15-day-old cultures on 2% yeast extract/1% peptone agar (VWR Scientific Products, San Dimas, CA, USA) in an atmosphere containing 12% CO₂ at 30 °C. Surface mycelium and conidia were scraped, transferred to phosphate-buffered saline (PBS) and filtered through Miracloth layers (22–25 µm; Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Arthroconidia concentration was determined by serial dilutions on Sabouraud's (Sab; 2% glucose/1% peptone) agar medium plates. Living *M. canis* arthroconidia were used for the experimental infection of the guinea pigs. For the peripheral blood mononuclear cell (PBMC) stimulation experiment, arthroconidia were heat-killed for 10 min at 95 °C, which was confirmed by the absence of growth on Sab plates incubated at 27 °C for 21 days.

***M. canis* immunogen**

The *M. canis* secreted component was obtained from *in-vitro*-produced arthroconidia grown in liquid Sab for five days at 27 °C [24]. Culture supernatant, corresponding to the secreted component, was separated from fungal elements by centrifugation, concentrated by ultrafiltration on an Amicon cell (Millipore, Billerica, MA, USA) using a filtration membrane with a size threshold of 10 kDa and stored at –20 °C until use. Protein concentrations were determined using the Bradford assay [26].

Experimental vaccination and challenge infection

The experimental design is detailed in Table 1. Guinea pigs were randomly allocated to four groups. Six guinea pigs were subcutaneously vaccinated with the secreted component coupled to the MPLA adjuvant (InvivoGen, San Diego, CA, USA) (group 1). A single 500- μ L dose of vaccine contained 50 μ g of secreted component and 25 μ g of MPLA adjuvant diluted in ultrapure water. Six animals received the adjuvant diluted in liquid Sab as a control group (group 2). Two other groups (groups 3 and 4), each consisting of three guinea pigs, received 500 μ L of PBS solution. Vaccination was performed three times at two-week intervals (on study days -70 , -56 and -42).

Six weeks after the last vaccination (study day 0), under general anaesthesia [medetomidine (500 μ g/kg) and ketamine (40 mg/kg)], the guinea pigs from groups 1, 2 and 3 were infected with *M. canis* while the animals from group 4 remained uninfected and served as an additional control. The 250- μ L inoculum, consisting of 3×10^5 *M. canis* arthroconidia suspended in 5% (w/w) poloxamer 407 solution, was applied on a 15-cm² area of the back skin surface that had been previously shaved and lightly abraded with a 25 G needle. Guinea pigs from group 4 were inoculated with 250 μ L of poloxamer only.

Table 1. Experimental design

Groups	Number of animals	Vaccine (500 μ L)	Experimental infection (250 μ L)
1	6	SC + MPLA	3×10^5 <i>M. canis</i> arthroconidia in poloxamer
2	6	MPLA diluted in liquid Sab	3×10^5 <i>M. canis</i> arthroconidia in poloxamer
3	3	PBS	3×10^5 <i>M. canis</i> arthroconidia in poloxamer
4	3	PBS	Poloxamer

SC: *Microsporium canis* secreted component; MPLA: monophosphoryl-lipid A adjuvant; Sab: Sabouraud medium; PBS: phosphate-buffered saline

Clinical and mycological follow-up

The course of infection was monitored weekly using four clinical criteria: alopecia, erythema, squamosis and crusts. For each clinical criterion, a score from 0 to 3 was attributed by a single examiner that was blinded as to the status of the guinea pigs (infected or not; vaccinated or not). In addition, a score of 0 or 1 was attributed according to the absence or presence of fluorescence of hair under a Wood's lamp, respectively. Microscopic examination of fluorescent hair confirmed the *M. canis* infection. A global score was calculated for each guinea pig by adding the clinical and fluorescence scores. Finally, a mean global score was calculated for each group of animals

Histology

Biopsy specimens were collected under general anaesthesia from one randomly selected guinea pig in each group at study days 0 and 17 post-infection (PI). Samples were fixed in 10% neutralized buffered formalin and paraffin embedded for routine processing. To assess the invasion of keratinized skin structures by *M. canis* and the histopathological lesions, 4- μ m thick sections were stained with periodic acid-Schiff and haematoxylin-eosin, respectively.

Blood sampling

Blood samples (250 μ L) were collected from the saphenous vein on days -70, -56, -42 and from day 0 to day 56 PI at two-week intervals in guinea pigs from groups 1 and 2. The serum samples were separated by centrifugation and stored at -20 °C until use.

Antibody response

An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was performed to assess the antibody response in vaccinated guinea pigs and control groups. All assays were performed in one batch at the end of the study period. The antigen consisting of *M. canis* secreted component, positive and negative reference antisera and rabbit anti-guinea pig immunoglobulins (Ig) were appropriately diluted after standard checkerboard titration. 96-well ELISA microplates (MICROLON[®] 600 High binding, Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) were coated with 100 μ L per well of 2.5 μ g/mL secreted component diluted in PBS (pH 7.2) and incubated for 1 h at 37 °C. Odd-numbered rows were sensitized with the antigen while even-numbered rows remained free of antigen as control wells. After washing with PBS, unoccupied protein-binding sites were blocked by the addition of 200 μ L per well of

dilution buffer consisting of a 3.6% solution of casein hydrolysate (Merck, Whitehouse Station, NJ, USA) in PBS containing 0.1% Tween 20 (PBS-T) for 1 h at 37 °C. Triplicate serum samples were diluted 1:100 in dilution buffer and 100 µL of each were added for 1 h at 37 °C to both the antigen-coated and control wells. After washing four times with PBS-T, 100 µL of horseradish-peroxidase-conjugated rabbit anti-guinea pig Ig (Polyclonal Anti-Guinea Pig Immunoglobulins/HRP, Dako, Glostrup, Denmark) diluted 1:1000 in dilution buffer, were added to each well. After a further 1-h incubation at 37 °C and three subsequent washes with PBS-T, peroxidase activity was revealed by addition of 100 µL of a solution containing tetramethylbenzidine and hydrogen peroxide. The reaction was stopped after 5 min by adding 100 µL of 1 N phosphoric acid and the absorbance at 450 nm was measured directly with a Multiscan RC spectrophotometer (Thermo Labsystems, Vantaa, Finland). On each ELISA plate, a positive reference consisting of serum from one previously *M. canis* experimentally infected guinea pig collected 14 days PI and a negative reference consisting of serum collected from the same guinea pig before experimental infection [27] diluted 1:100, were processed alongside the samples in triplicate. Optical density was defined as the difference between the mean absorbance for each triplicate serum sample tested and the control wells.

Isolation and stimulation of PBMCs

At study day 56 PI, three guinea pigs from groups 1, 2, 3 and 4 were anaesthetized and blood samples were collected by intracardiac puncture before euthanasia. Heparinized blood was diluted 1:4 in calcium- and magnesium-free Hank's buffered salt solution (CMF-HBSS) and incubated for 30 min at room temperature. Four mL of diluted blood was layered over 10 mL of Ficoll-Paque™ PLUS 1077 solution (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden) and centrifuged for 30 min at 400 g. The PBMC ring was harvested, washed twice in CMF-HBSS and suspended in 24-well cell culture plates (Greiner Bio-One) at a concentration of 5×10^5 cells/mL in RPMI 1640 + GlutaMAX™ medium (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% foetal calf serum (Gibco Life Technologies) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco Life Technologies). Cells were stimulated with either 5 µg of secreted component (or with liquid Sab as negative control) or with 5×10^4 heat-killed arthroconidia (HKA) (or PBS as negative control) for 72 h at 37 °C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. After stimulation, the PBMCs were collected by centrifugation and cell pellets were stored at -80 °C until use. All experiments were performed in triplicate.

Quantification of IFN γ and IL-4 mRNA levels in PBMCs

Cell pellets were thawed on ice and total RNA was isolated using TRIzol[®] reagent (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) as recommended by the manufacturer. The purified RNA was treated with DNase I (Invitrogen). Template cDNA was synthesized from RNA by reverse transcription using iScript[™] cDNA Synthesis kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Reverse transcriptase was omitted in the control reactions. The sequences of oligonucleotide primers for guinea pig 18S rRNA (internal control), IFN γ and IL-4 have already been published [28, 29] and were synthesized by Eurogentec (Liège, Belgium) (Table 2). The quantitative PCR reactions were assembled using the iQ[™] SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad) and subjected to the following protocol in a MiniOpticon System (Bio-Rad): 10 min at 95 °C and 45 cycles of 45 s at 95 °C, 45 s at 60 °C and 45 s at 72 °C. The melting curve was performed from 45 °C to 95 °C in 1 °C/15 s increments. Results in terms of cycle thresholds were converted to folds 18S rRNA expression using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method [30]. The levels of cytokine mRNA in stimulated PBMCs were expressed relative to that in the negative control PBMCs.

Statistical analysis

The two-way analysis of variance (ANOVA) test followed by Bonferroni post hoc tests was used for the statistical comparison of both mean global scores and ELISA results between the vaccinated and the non-vaccinated groups. This test was performed with the GraphPad Prism 5.0 statistical software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The levels of cytokine mRNA in stimulated PBMCs were compared with those determined in negative control PBMCs using a general linear model (GLM procedure of SAS; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). A *P* value of < 0.05 was considered as statistically significant.

Table 2. Sequences of oligonucleotide primers

Target gene	Forward sense (5'→3')	Reverse sense (5'→3')
18S rRNA	TGCATGGCCGTTCTTAGTTG	AGTTAGCATGCCAGAGTCTCGTT
IFN γ	ATTCGGTCAATGACGAGCAT	GTTTCCTCTGGTTCGGTGACA
IL-4	CATCGGCATTTTGAACGAGGTCA	CTATCGATGAATCCAGGCATCG

Results

Clinical and mycological follow-up

All guinea pigs from group 3, four guinea pigs from group 1 and one guinea pig from group 2 developed clinical signs consistent with dermatophytosis (Fig. 1). Typical skin lesions were observed from day 7 PI and were associated with a positive Wood's lamp examination. Mean global scores, accounting for clinical and fluorescence scores are shown in Fig. 2. Group 1 and 2 had a significantly lower mean global score than group 3 on days 14 and 28 PI and on days 14, 21 and 28 PI, respectively. No significant difference was observed between groups 1 and 2.

Histology

As expected, at study day 0, no fungal elements were found in keratinized structures of all sampled guinea pigs (Fig. 3A). Seventeen days PI, *M. canis* was shown to have colonized hair follicles of sampled guinea pigs from groups 1, 2 and 3 who developed dermatophytosis (Fig. 3B).

To assess histopathological lesions, skin biopsy sections were stained with haematoxylin-eosin. No inflammatory skin lesions were observed in the skin of guinea pigs at study day 0 (Fig. 4A). On day 17 PI, sampled guinea pigs from groups 1, 2 and 3 showed inflammatory skin lesions characterized by epidermal acanthosis, spongiosis, erosions and a diffuse to perifollicular cellular infiltration in the dermis (Figs. 4B, C). Subjectively, inflammatory lesions did not differ from one group to another.

Antibody response

Guinea pigs from group 1 developed a very high antibody response towards the *M. canis* secreted component that was used as the vaccine, which was detectable from 28 days after the first vaccination until day 56 PI (Fig. 5). Maximal responses were observed at the end of the experiment (study day 56 PI). From day -42 until the end of the study, the antibody titres in guinea pigs from group 1 were significantly higher than those observed in animals from group 2 that received the MPLA adjuvant without the *M. canis* secreted component.

IFN γ and IL-4 production by PBMCs

The levels of IFN γ and IL-4 mRNA expressed in PBMCs were evaluated by quantitative RT-PCR at the end of the study period (Fig. 6). When stimulated with the *M. canis* secreted component, the level of IFN γ mRNA was higher in group 1 than in other groups. However, a statistically significant difference was only observed by comparing with group 3 which consisted of guinea pigs that were infected with *M. canis* having received PBS. In the PBMCs stimulated with the secreted component, the level of IL-4 mRNA increased significantly in group 1 with regard to the group 2. In group 4, the level of IL-4 mRNA was significantly higher than in groups 2 and 3.

When stimulated with HKA, both IFN γ and IL-4 mRNA levels increased in groups 2 and 3 but the differences observed were not statistically significant.

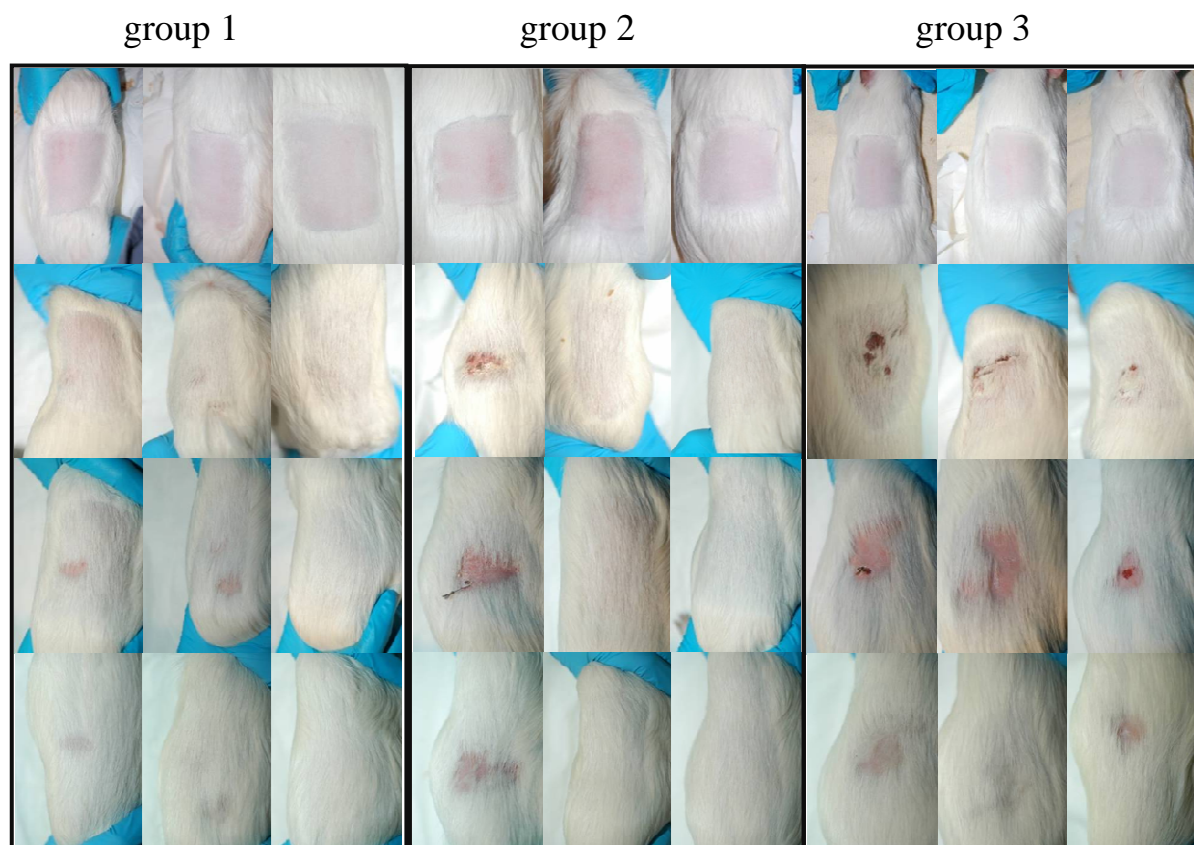


Fig. 1. Comparative clinical follow-up of skin lesion development in vaccinated and non vaccinated guinea pigs after experimental infection with *Microsporium canis*. D, day post-infection are indicated on the left.

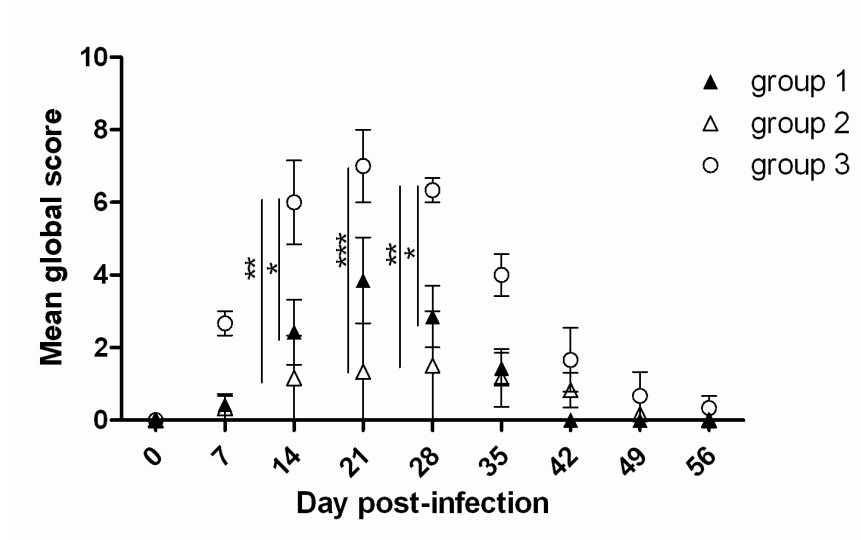


Fig. 2. Kinetics of mean global scores (\pm SEM) in vaccinated and non vaccinated guinea pigs after experimental infection with *Microsporum canis*. A significant lower mean global score was observed in groups 1 and 2 in comparison with the group 3 on days 14 and 28 post-infection (PI) and on days 14, 21 and 28 PI, respectively. Mean global scores were assessed blindly on the basis of clinical and mycological criteria. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

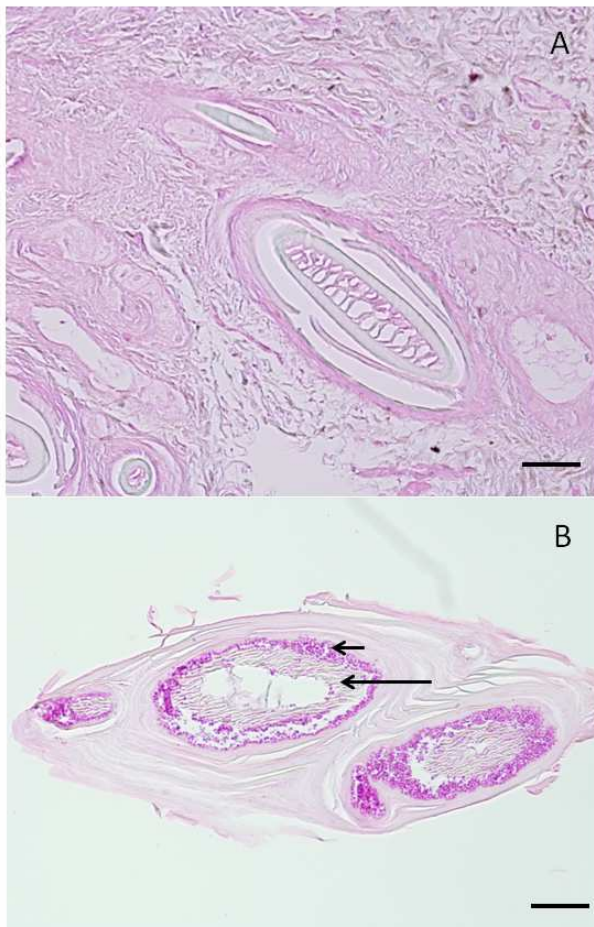


Fig. 3. Skin histopathology showing hair follicles in a guinea pig from group 1 at days 0 (A) and 17 (B) after experimental infection with *Microsporum canis*. Periodic acid-Schiff staining reveals the presence of hyphae inside the hair shaft (long arrow) and the surrounding dermatophytic conidia (short arrow). Scale bars represent 50 μ m.

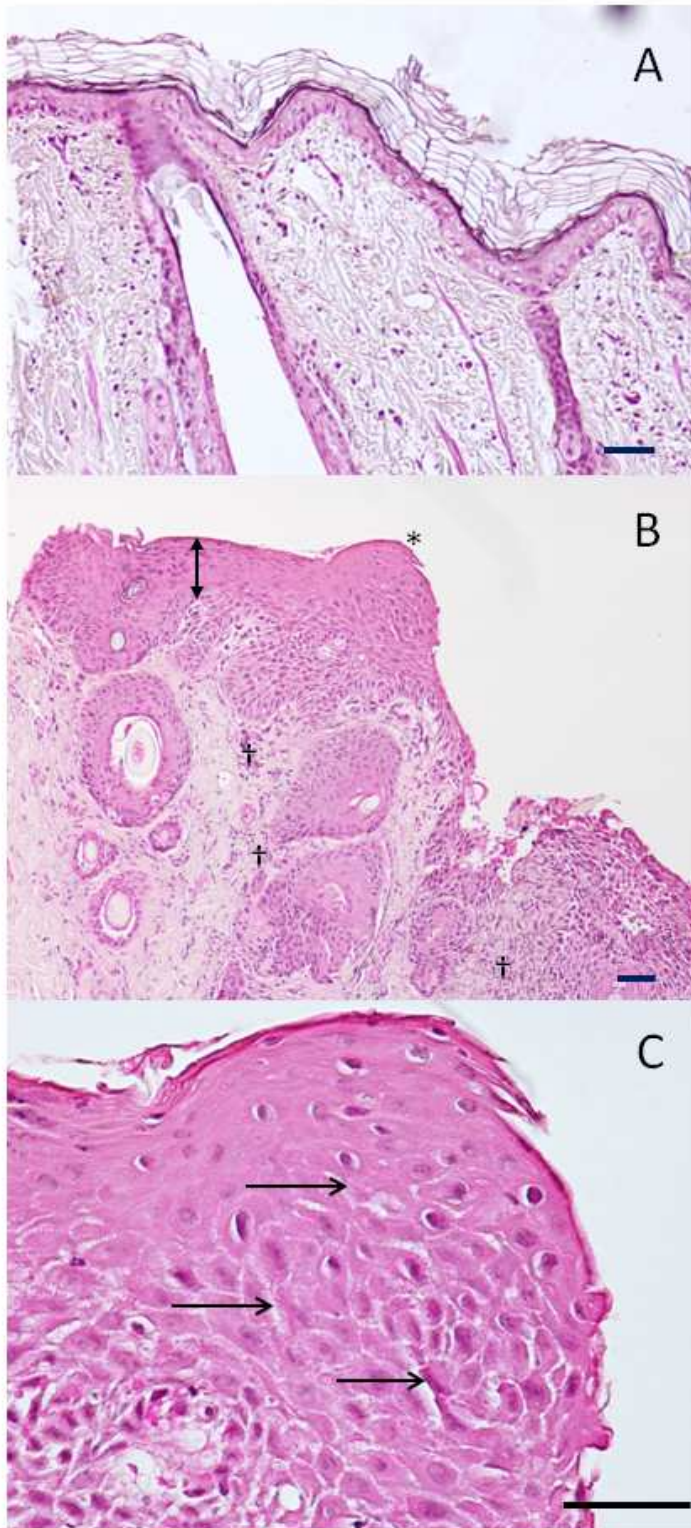


Fig. 4. Evaluation of skin histopathological lesions in a guinea pig from group 1 at days 0 (A) and 17 (B, C) after experimental infection with *Microsporium canis*. Hematoxylin-eosin staining shows significant inflammatory lesions (B) characterized by epidermal acanthosis (double arrow), erosions (*) and a moderate cellular infiltration in the dermis (†). Higher magnification shows epidermal spongiosis (C). Scale bars represent 50 μm.

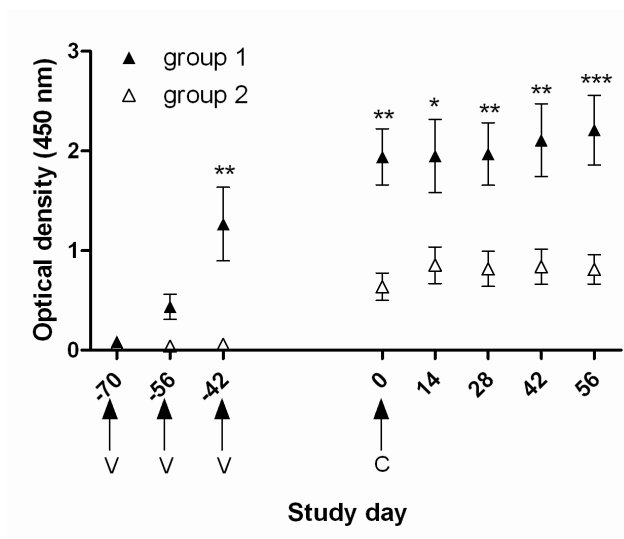


Fig. 5. Evolution of the antibody response (optical density \pm SEM) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) against the *Microsporium canis* secreted component in guinea pigs from group 1 and group 2. V: vaccination; C: challenge infection. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

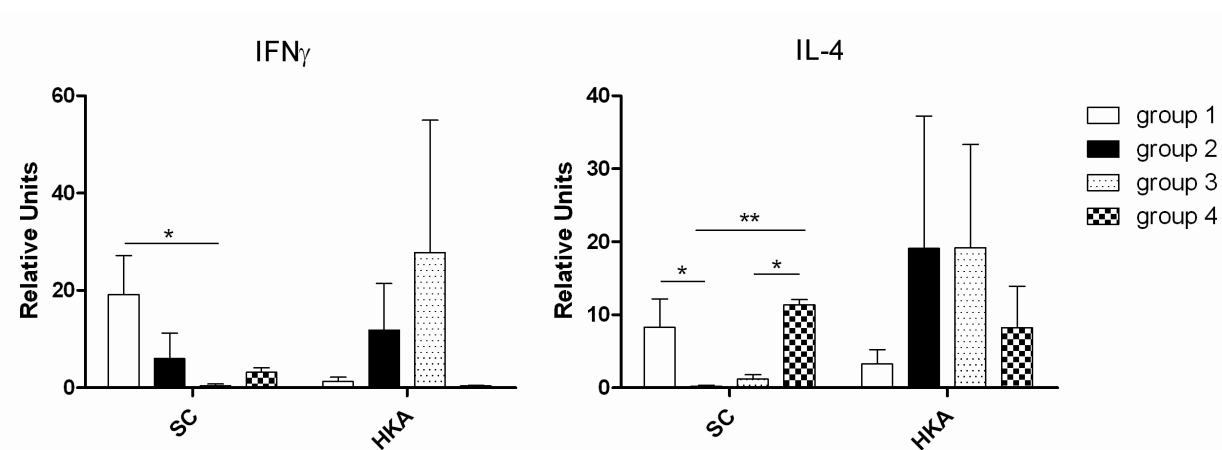


Fig. 6. Quantification of interferon (IFN) γ and interleukin (IL)-4 mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) stimulated with either the *Microsporium canis* secreted component (SC) or heat-killed arthroconidia (HKA) in guinea pigs from groups 1, 2, 3 and 4 at day 56 post-infection.. The levels of IFN γ and IL-4 mRNA in stimulated PBMCs were quantified by quantitative RT-PCR and expressed relative to that in negative control PBMCs. Data are representative of 3 independent experiments (mean \pm SEM). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Discussion

The most remarkable and unexpected result of this vaccination trial was the partial protective effect conferred by the MPLA adjuvant in guinea pigs exposed to a challenge infection with *M. canis*. Despite the limited number of animals used in this study, the results clearly show that the MPLA, rather than the selected *M. canis* antigen, is responsible for the protective effect. MPLA is a detoxified form of the endotoxin lipopolysaccharide recognized by TLR-4 [31] and its efficacy and safety have been proven in many studies [23, 32]. More precisely, MPLA improves the innate immune response to bacterial infection by enhancing

the bacterial clearance and increasing the number of cells with phagocytic functions at the sites of infection [33]. It is also able to stimulate the adaptive immune response by promoting the differentiation of CD4⁺ T cells into IFN γ -producing Th1 cells in mice [23]. In dermatophytosis, the protective immune response is considered to be of the Th1 type and associated with a DTH [20-22]. We can postulate that the MPLA adjuvant used in this study could stimulate the Th1 immune response in guinea pigs and therefore contribute to the partial protection against the challenge infection with *M. canis*. In some vaccine trials performed in mice, the MPLA adjuvant has been used in combination with other adjuvants such as alum [34, 35]. This association led to a more favourable profile of both humoral and cell-mediated immune responses. The efficacy of MPLA observed in our study could be enhanced by addition of alum or other pro-Th1 adjuvants such as oligodeoxynucleotides (ODNs) containing unmethylated CpG motifs. Indeed, these CpG ODNs improve the function of professional antigen-presenting cells and mainly boost the cellular vaccine-specific immune response [36].

Although it produces DTH in guinea pigs having spontaneously recovered from an experimental infection with *M. canis* (Mignon, personal communication), the secreted component did not confer an additional protection effect with regard to the MPLA alone, suggesting that this component could be not protective *per se*. Because it consists of a mix of proteins, the secreted component may contain some antigens able to negatively modulate the immune response. Such immunomodulatory effects have already been revealed for other dermatophytes, such as *Trichophyton rubrum*, which is able to grow inside macrophages after phagocytosis [37]. Therefore, the characterization and the selection of appropriate antigens from the secreted component appear to be of major importance in the development of a highly effective vaccine against *M. canis*.

Vaccination induced a strong antibody response towards the secreted component. Specific antibodies have been shown to be produced during *M. canis* [38, 39] and other dermatophytic infections [40] but no correlation has been observed between antibody titres and recovery from the disease. The coexistence of protective and useless or even blocking antibodies in immune sera [41, 42] could be responsible for the apparently unimportant role of humoral immunity in most fungal diseases. The strong antibody response induced by the *M. canis* secreted component could be irrelevant or even detrimental with regard to protection against challenge infection. In other studies, high titres of specific antibodies of the IgE subclass were shown to be associated with chronic dermatophytosis and a weak cellular immune response [40]. In forthcoming vaccine trials against dermatophytosis, it would

therefore be of interest to assess the specific IgE response potentially induced by the vaccine candidates.

To determine whether the *M. canis* secreted component has promoted the development of a Th1 or Th2 response during the vaccination trial, the PBMCs were stimulated with the secreted component. A significant increase in both IFN γ and IL-4 production was observed in vaccinated animals, suggesting that this component is able to promote both a Th1 and a Th2 response. The humoral response induced by the *M. canis* secreted component is known to be unrelated with protection in dermatophytoses [21, 22], strengthening our hypothesis that this component may contain immunomodulatory antigens.

We have also evaluated whether vaccination induced pro-Th1 or pro-Th2 cytokines by stimulating PBMCs with HKA, but the absence of any statistically significant differences hindered the drawing of definitive conclusions.

In conclusion, our results show that the MPLA adjuvant used in this vaccine trial can induce a partial protection against a *M. canis* infection. Nevertheless, the secreted component alone does not seem to confer an additional protection in vaccinated guinea pigs in our experimental conditions.

Acknowledgements

Funding sources: This study was supported by grant 3.4558.10 from Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (FRSM, Belgium) and 594/2012 from the Executive Unit for Higher Education, Research, Development and Innovation Funding (UEFISCDI, Romania). This publication was possible thanks to the agreement that binds Wallonia-Brussels (WBI) and Romania. L.C. is the recipient of a studentship from FRIA (Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture, 1000 Brussels, Belgium). E.T.B. was the recipient of a research grant provided by the University of Liège.

Declaration of interest: The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the manuscript.

The authors thank Françoise Maréchal, Joëlle Piret and Aurore Arous for technical assistance and Prof. Brigitte Evrard (Laboratory of Pharmaceutical Technology, University of Liège, Liège, Belgium) for providing the poloxamer.

References

1. Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 1995; **8**: 240-259.
2. Chermette R, Ferreiro L, Guillot J. Dermatophytoses in animals. *Mycopathologia* 2008; **166**: 385-405.
3. Mignon B, Monod M. Zoonotic infections with dermatophyte fungi. In: Palmer SR, Soulsby EJ, Torgerson PR, Brown DWG, eds. *Zoonoses*. Oxford: Oxford University Press, 2011; 838-849.
4. Mignon B, Losson B. Prevalence and characterization of *Microsporum canis* carriage in cats. *J Med Vet Mycol* 1997; **35**: 249-256.
5. Seebacher C, Bouchara JP, Mignon B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia* 2008; **166**: 335-352.
6. Carlotti DN, Guinot P, Meissonnier E, Germain PA. Eradication of feline dermatophytosis in a shelter: a field study. *Vet Dermatol* 2010; **21**: 259-266.
7. Moriello KA. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. *Vet Dermatol* 2004; **15**: 99-107.
8. Lund A, Deboer DJ. Immunoprophylaxis of dermatophytosis in animals. *Mycopathologia* 2008; **166**: 407-424.
9. Westhoff DK, Kloes M-C, Orveillon FX, *et al.* Treatment of feline dermatophytosis with an inactivated fungal vaccine. *Open Mycol J* 2010; **4**: 10-17.
10. Elad D, Segal E. Immunogenicity in guinea-pigs of a crude ribosomal fraction from *Microsporum canis*. *Vaccine* 1994; **12**: 134-138.
11. Elad D, Segal E. Immunogenicity in calves of a crude ribosomal fraction of *Trichophyton verrucosum*: a field trial. *Vaccine* 1995; **13**: 83-87.
12. Milan R, Alois R, Josef C, Jana B, Evzen W. Recombinant protein and DNA vaccines derived from hsp60 *Trichophyton mentagrophytes* control the clinical course of trichophytosis in bovine species and guinea-pigs. *Mycoses* 2004; **47**: 407-417.

13. DeBoer DJ, Moriello KA, Blum JL, Volk LM, Bredahl LK. Safety and immunologic effects after inoculation of inactivated and combined live-inactivated dermatophytosis vaccines in cats. *Am J Vet Res* 2002; **63**: 1532-1537.
14. DeBoer DJ, Moriello KA. The immune response to *Microsporum canis* induced by a fungal cell wall vaccine. *Vet Dermatol* 1994; **5**: 47-55.
15. DeBoer DJ, Moriello KA. Investigations of a killed dermatophyte cell-wall vaccine against infection with *Microsporum canis* in cats. *Res Vet Sci* 1995; **59**: 110-113.
16. Gudding R, Naess B. Vaccination of cattle against ringworm caused by *Trichophyton verrucosum*. *Am J Vet Res* 1986; **47**: 2415-2417.
17. Gudding R, Lund A. Immunoprophylaxis of bovine dermatophytosis. *Can Vet J* 1995; **36**: 302-306.
18. Descamps FF, Brouta F, Vermout SM, *et al.* A recombinant 31.5 kDa keratinase and a crude exo-antigen from *Microsporum canis* fail to protect against a homologous experimental infection in guinea pigs. *Vet Dermatol* 2003; **14**: 305-312.
19. Vermout SM, Brouta FD, Descamps FF, Losson BJ, Mignon BR. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a *Microsporum canis* metalloprotease subunit vaccine in guinea pigs. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; **40**: 75-80.
20. Calderon RA. Immunoregulation of dermatophytosis. *Crit Rev Microbiol* 1989; **16**: 339-368.
21. Almeida SR. Immunology of Dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008; **166**: 277-283.
22. Mignon B, Tabart J, Baldo A, *et al.* Immunization and dermatophytes. *Curr Opin Infect Dis* 2008; **21**: 134-140.
23. Thompson BS, Chilton PM, Ward JR, Evans JT, Mitchell TC. The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells. *J Leukocyte Biol* 2005; **78**: 1273-1280.
24. Cambier L, Mathy A, Baldo A, *et al.* Feline polymorphonuclear neutrophils produce pro-inflammatory cytokines following exposure to *Microsporum canis*. *Vet Microbiol* 2013; **162**: 800-805.

25. Tabart J, Baldo A, Vermout S, *et al.* Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for *Microsporium canis* dermatophytosis. *J Med Microbiol* 2007; **56**: 971-975.
26. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248-254.
27. Mignon B, Leclipteux T, Focant C, *et al.* Humoral and cellular immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporium canis* in experimentally infected guinea pigs. *Med Mycol* 1999; **37**: 123-129.
28. Allen SS, McMurray DN. Coordinate cytokine gene expression *in vivo* following induction of tuberculous pleurisy in guinea pigs. *Infect Immun* 2003; **71**: 4271-4277.
29. Oh C, Dong Y, Liu H, Thompson LP. Intrauterine hypoxia upregulates proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in fetal guinea pig hearts. *Am J Obstet Gynecol* 2008; **199**: 78 e71-76.
30. Livak KJ., Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 2001; **25**: 402-408.
31. Johnson AG, Tomai M, Solem L, Beck L, Ribic E. Characterization of a nontoxic monophosphoryl lipid A. *Rev Infect Dis* 1987; **9 Suppl 5**: 512-516.
32. Casella CR, Mitchell TC. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. *Cell Mol Life Sci* 2008; **65**: 3231-3240.
33. Romero CD, Varma TK, Hobbs JB, *et al.* The Toll-like receptor 4 agonist monophosphoryl lipid a augments innate host resistance to systemic bacterial infection. *Infect Immun* 2011; **79**: 3576-3587.
34. Quintilio W, Kubrusly FS, Iourtov D, *et al.* *Bordetella pertussis* monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. *Vaccine* 2009; **27**: 4219-4224.
35. Morello CS, Kraynyak KA, Levinson MS, *et al.* Inactivated HSV-2 in MPL/alum adjuvant provides nearly complete protection against genital infection and shedding following long term challenge and rechallenge. *Vaccine* 2012; **30**: 6541-6550.

36. Bode C, Zhao G, Steinhagen F, Kinjo T, Klinman DM. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev Vaccines* 2011; **10**: 499-511.
37. Campos MR, Russo M, Gomes E, Almeida SR. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes Infect* 2006; **8**: 372-379.
38. DeBoer DJ, Moriello KA. Humoral and cellular immune responses to *Microsporium canis* in naturally occurring feline dermatophytosis. *J Med Vet Mycol* 1993; **31**: 121-132.
39. Sparkes AH, Stokes CR, Gruffydd-Jones TJ. Humoral immune responses in cats with dermatophytosis. *Am J Vet Res* 1993; **54**: 1869-1873.
40. Woodfolk JA, Slunt JB, Deuell B, Hayden ML, Platts-Mills TA. Definition of a *Trichophyton* protein associated with delayed hypersensitivity in humans. Evidence for immediate (IgE and IgG4) and delayed hypersensitivity to a single protein. *J Immunol* 1996; **156**: 1695-1701.
41. Casadevall A, Feldmesser M, Pirofski LA. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2002; **5**: 386-391.
42. Bromuro C, Torosantucci A, Chiani P *et al.* Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated Candidiasis in recipients of a *Candida albicans* vaccine. *Infect Immun* 2002; **70**: 5462-5470.

**Evaluation de la réponse immune cutanée au cours d'une dermatophytose
à *Arthroderma benhamiae* et *Arthroderma vanbreuseghemii* en utilisant un
modèle murin expérimental**

*Assessment of the cutaneous immune response during Arthroderma
benhamiae and Arthroderma vanbreuseghemii infection using an
experimental mouse model*

Préambule

Les outils permettant d'étudier *in vivo* la réponse immune générée au cours d'une dermatophytose sont peu nombreux. L'animal le plus utilisé dans l'étude des dermatophytoses est le cobaye (Mignon *et al.*, 1999b ; Descamps *et al.*, 2003b ; Vermout *et al.*, 2004 ; Saunte *et al.*, 2008). Celui-ci représente un bon modèle car les symptômes et les lésions de dermatophytose développés lors de l'infection expérimentale sont identiques à ceux observés au cours d'une infection naturelle et disparaissent spontanément. Cependant, il existe peu d'outils génétiques et immunologiques disponibles chez cette espèce. De plus, le caractère non consanguin des cobayes engendre une hétérogénéité importante dans l'intensité des symptômes cutanés et des lésions entre individus (Vermout *et al.*, 2004). L'utilisation d'un modèle murin de dermatophytose est donc nécessaire pour étendre nos connaissances sur la réponse immune anti-dermatophytes.

Pour l'établissement de notre modèle murin, représentatif d'une infection naturelle, trois espèces de dermatophytes ont été utilisées : *A. benhamiae*, *A. vanbreuseghemii* et *M. canis*. Après infection des souris par les différents champignons, des examens cliniques et histologiques ont été réalisés. La réponse immune générée au cours de l'infection a été étudiée par analyse des cellules immunes recrutées au site d'infection ainsi que par la détermination des taux d'ARNm cytokiniques.

L'infection expérimentale par *M. canis* n'ayant provoqué que de très faibles symptômes chez seulement 40 % des souris, les analyses histologiques ainsi que l'évaluation de la réponse immune générée n'ont pas été réalisées dans ce groupe.

Les résultats de cette étude ont été récemment publiés dans la revue *British Journal of Dermatology*.

Assessment of the cutaneous immune response during *Arthroderma benhamiae* and *Arthroderma vanbreuseghemii* infection using an experimental mouse model

British Journal of Dermatology (doi: 10.1111/bjd.12673)

Ludivine Cambier, Alodie Weatherspoon, Valérie Defaweux, Elena-Tatiana Bagut, Marie-Pierre Heinen, Nadine Antoine, Bernard Mignon

Abstract

Background Dermatophytoses are common but poorly understood skin infections. Most *in vivo* studies have been performed using the guinea pig as the experimental animal model, which has several limitations.

Objectives To develop a mouse model of dermatophytosis suitable for multiple purposes, including the investigation of immunity against dermatophytes.

Methods Two peculiar fungal strains, *Arthroderma benhamiae* and *Arthroderma vanbreuseghemii*, isolated from tinea in men having contact with rodents were used for epicutaneous inoculation. During the infection, clinical and histopathological follow-up were performed. The recruitment of immune cells was evaluated by immunofluorescence staining and the levels of cytokines mRNA were quantified by quantitative RT-PCR in skin of infected mice.

Results The skin symptoms and microscopic lesions, including the colonization of keratinized epidermal and follicular structures by both dermatophytes, were highly similar to those observed in guinea pig infection models and in natural infections, mimicking acute superficial tinea in humans. The dermal inflammatory cellular infiltrate consisted of macrophages, dendritic cells, and especially polymorphonuclear neutrophils, which are one of the histologic ‘clues’ to the diagnosis of dermatophytosis. The *in situ* cytokine profile was characterized by the overexpression of TGF- β , IL-1 β , and IL-6 mRNAs during infection, suggesting a role of the Th17 pathway in the establishment of immunity.

Conclusions Our new reproducible and validated mouse model of dermatophytosis is a modern *in vivo* tool that allows a more in-depth understanding of the pathogenesis of human dermatophyte infections.

Introduction

Dermatophytes are pathogenic filamentous fungi responsible for superficial cutaneous infections called dermatophytoses.¹ They specifically invade keratinized structures such as *stratum corneum*, hair, nails and claws. Based on their ecological features, three groups of dermatophyte species are recognized, namely anthropophilic, restricted to humans, zoophilic, found predominantly in animals and geophilic, recovered from the soil without or only sporadically causing disease.²

Despite their superficial localization in keratinized structures, dermatophytes can induce an adaptive immune response. The Th1 cellular response, associated with delayed type hypersensitivity (DTH), appears to be correlated with clinical recovery and protection against reinfection.³⁻⁵ Nevertheless, the Th17 pathway could also be involved in the establishment of a protective immunity in dermatophytoses as has been shown for other fungi such as *Candida albicans*⁶⁻⁸ and *Aspergillus fumigatus*.^{7, 9} Little is known about the mechanisms involved in the establishment of a protective immune response during dermatophytosis.^{4, 5, 10} Some *in vitro* studies about immunity against dermatophytes have demonstrated that keratinocytes,¹¹ neutrophils¹² and dendritic cells¹³ are able to produce pro-inflammatory cytokines in response to infection. Nevertheless, *in vivo* studies are essential in furthering our understanding of immunity against dermatophytes. Therefore, the establishment of an animal model of dermatophytosis is required. Currently, the most frequently used animal model is the guinea pig¹⁴⁻¹⁷ but the inbred nature, and the genetic and immunologic tools available in the mouse species, support the use of a model in the study of immune response against dermatophytes.¹⁸ Only few mouse models of dermatophytoses are available. A former model using *Trichophyton quinckeanum* was successfully used for both histopathologic^{19, 20} and immunologic precursory studies.^{21, 22} However, this model is questionable because *T. quinckeanum* is a rare agent of dermatophytosis in humans, moreover responsible for a particular clinical entity named mouse favus.²³ Two other models using dermatophytes in mice were recently described but they are not representative of a superficial natural infection.^{24, 25}

In this study, we focused on two zoophilic dermatophyte species that are frequently isolated from superficial tinea in men: *Arthroderma benhamiae*, which primarily affects guinea pigs and the closely related *Arthroderma vanbreuseghemii* which affects other animal species, notably cats and dogs but very rarely rodents including mice.²⁶ Both species belong to the *Trichophyton mentagrophytes* complex²⁶⁻²⁸ and are readily manipulable at the genetic

level.²⁹⁻³¹ These features urged us to test both *A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* species by using two isolates originating from humans in contact with either the guinea pig or mouse, respectively. Although some mycologists still use the nomenclature *T. mentagrophytes* complex, the sexual names *A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* should always be used according to the rules proposed by the Amsterdam declaration on Fungal Nomenclature.³²

The aim of this work was to develop a reproducible experimental mouse model of dermatophytosis using *A. benhamiae* or *A. vanbreuseghemii*, and subsequently to assess the cutaneous immune response generated during infection. To this purpose, the immune cells recruited to the site of infection were defined and the cytokine response induced in skin of infected mice was assessed.

Materials and Methods

Fungal strains

Arthroderma benhamiae IHEM 20163 (Institute of Hygiene and Epidemiology-Mycology [IHEM], Brussels, Belgium) was originally isolated from a patient suffering from inflammatory tinea faciei and who had had previous contact with a guinea pig.³³ This *A. benhamiae* strain has been characterized at the molecular level²⁷ and was successfully used to develop a guinea pig infection model for this species.²⁹ *Arthroderma vanbreuseghemii* IHEM 22740 was chosen because of its peculiar origin, namely a patient in contact with mouse and having highly inflammatory tinea manum.²⁷ This strain is closely related to *A. vanbreuseghemii* isolated from dogs and cats and causing various inflammatory tinea in humans.²⁷ Both strains were grown for 15 days at 27 °C on Sabouraud's plates (Sab; 2% glucose-1% peptone), and used for the experimental infection.

Animals and experimental infection

Eighteen specific-pathogen-free 2-month-old female mice of C57BL/6 strain (Charles River, Wilmington, MA, USA) were used and housed separately during the entire study period. Mice were divided into 3 groups. The *A. benhamiae* group (n=6) was inoculated with 4.2×10^{10} colony forming units (CFU), the *A. vanbreuseghemii* group (n=6) received 2×10^{11} CFU while the mice from the control group (n=6) remained uninfected. Experimental infection was performed under general anaesthesia (medetomidine [1 mg kg^{-1}] and ketamine [40 mg

kg⁻¹]) administered by intraperitoneal injection. Backs of the animals were shaved and lightly abraded with a 25G needle. The inoculum (300 µl) consisting of mycelia and spores collected from cultures on Sab plates was suspended in 5% (w/w) poloxamer 407 and gently rubbed onto the skin with a sterile pipette tip. Mice from the control group received 300 µl of poloxamer only. For histology, immunofluorescence staining and quantification of cytokines, 3 infected mice were randomly selected from each group and skin biopsies samples were collected. Animal experiments were approved by the local ethics committee (University of Liège, ethics protocol no. 943).

Clinical follow-up

Infected mice were monitored twice a week for 5 weeks by two independent examiners using clinical criteria i.e., alopecia and squamosis-crusting. Both investigators who remained the same throughout the experiment were blinded as to the status of mice (infected or not). For each clinical criterion, a score of 0, 1, 2 or 3 (absence, mild, moderate or severe skin lesion) was attributed. A clinical score was then calculated for each mouse by adding scores for both criteria. Finally, a median clinical score was calculated for each group of mice.

Histology

Skin samples collected at days 3, 7, 14 and 21 post-inoculation (PI) were fixed in 10% neutralized buffered formalin and paraffin embedded for routine processing. Sections of 4 µm thick sections were stained with haematoxylin and eosin (H&E) for histopathologic evaluation or with periodic acid-Schiff (counterstained with haematoxylin) to assess the fungal invasion in keratinized skin structures.

Immunofluorescence staining

At day 7 PI, skin samples collected from mice were immersed in tissue-TEK OCT embedding medium (Sakura, Zouterwoude, The Netherlands) and quickly frozen at -80 °C. Sections (8-10 µm) were cut at -20 °C with a microtome (Microtom HM 500 OM, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), mounted on glass slides coated with poly-L-Lysine (Sigma, St. Louis, MO, USA), fixed in acetone for 10 min at 4 °C, and stored at -20 °C until used. After rehydration in PBS, cryosections were incubated for 1 h at room temperature with appropriate primary antibodies diluted 1:100 in PBS. After washing in PBS, sections were incubated for 30 min at room temperature with Alexa Fluor488 streptavidin or species-

specific secondary antibody (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands). The characteristics of primary and secondary antibodies are listed in Table 1. A fluorescent dye for nuclear staining, the TOPRO-3-iodide (Molecular Probes) was added to cryosections labelled with anti-major histocompatibility complex (MHC) II and anti-CD54 antibodies. To test the general specificity of the antibodies used, samples were incubated with irrelevant antibodies. Negative controls were obtained by incubating samples with secondary antibodies only.

Quantification of cytokine mRNA levels in skin biopsies

At day 0, 7 and 21 PI, skin biopsy specimens were homogenized using the FastPrep[®] instrument (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA). Total RNA was isolated using TRIzol reagent following the manufacturer's instructions (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). The purified RNA was treated with DNase I (Invitrogen). Template cDNA was synthesized from RNA by reverse transcription, using iScript[™] cDNA Synthesis kit (Bio-rad, Hercules, CA, USA). Reverse transcriptase was omitted in control reactions. The sequences of oligonucleotide primers have already been published (12S rRNA, Tumor Necrosis Factor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β , IL-6 and IL-22)³⁴⁻³⁶ or were selected (IL-10 and Transforming Growth Factor (TGF)- β) using the Primer-BLAST program

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi?LINK_LOC=BlastHomeAd).

The primers for mouse 12S rRNA (internal control) and cytokines were synthesized by Eurogentec (Liège, Belgium) (Table 2). The quantitative PCR (qPCR) reactions were assembled using the iQ[™] SYBR[®] Green Supermix (Bio-rad) and subjected to the following protocol in a MiniOpticon System (Bio-rad): 10 min at 95 °C and 50 cycles of 45 s at 95 °C, 45 s at 60 °C and 45 s at 72 °C. The melting curve was performed from 45 °C to 95 °C in 1 °C/15 s increments. All assays were performed in duplicate. Results in terms of cycle thresholds were converted in folds 12S rRNA expression using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. The level of cytokine mRNA in skin biopsies at day 7 or 21 PI was expressed relative to that in skin biopsies at day 0.

Statistical analysis

The two-way analysis of variance (ANOVA) test was used for the statistical comparison of median clinical scores between the infected and control mice. This test was performed with

the Graph pad Prism 5.0 statistical software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The levels of cytokine mRNA in skin biopsies, 7 and 21 days PI were compared with those determined in skin biopsies at day 0 using a general linear model (GLM procedure of SAS; SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). $P < 0.05$ was considered as statistically significant.

Table 1. Antibodies used for immunofluorescence staining

Primary antibody	Target	Secondary antibody	Source
Rat anti-mouse MHC II FITC	MHC II	-	Chemicon International (Temecula, CA, USA)
Rat anti-mouse CD54 (ICAM-I) Biotin	Macrophages	Streptavidin Alexa 488	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Hamster Anti-mouse CD11c Biotin	DCs	Streptavidin Alexa 488	eBioscience (San Diego, CA, USA)
Rat anti-mouse neutrophil	PMNs	Goat Anti-rat Alexa 594	Abcam (Cambridge, UK)

MHC II: class II major histocompatibility complex; DCs: dendritic cells; PMNs: polymorphonuclear neutrophils

Table 2. Sequences of oligonucleotide primers

Target gene	Forward sense (5' → 3')	Reverse sense (5' → 3')
12s rRNA	GGAAGGCATAGCTGCTGGAGGT	CGATGACATCCTTGGCCTGA
TNF α	TTCATCAGTTCTATGGCCC	GGGAGTAGACAAGGTACAAC
IL-1 β	TTGACGGACCCCAAAAGATG	AGAAGGTGCTCATGTCCTCA
IL-6	GTTCTCTGGGAAATCGTGGA	TGTACTCCAGGTAGCTAT GG
TGF β	GCTTTCGATTCAGCGCTCACT	TCCAACCCAGGTCCTTCCTAA
IL-10	AGCCGGGAAGACAATAACTG	CATTTCCGATAAGGCTTGG
IL-22	GGCCAGCCTTGCAGATAACA	GCTGATGTGACAGGAGCTGA

Results

Mice infected with *A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* develop clinical lesions of dermatophytosis

All animals infected with *A. vanbreuseghemii* and 80% of mice infected with *A. benhamiae* showed consistent dermatophytosis lesions. This contrasts with previous experiments suggesting that the C57BL/6 strain mice are resistant to dermatophytosis.²¹ Clinical signs of dermatophytosis were obvious 4 days after infection and were maximal at day 19 PI for both dermatophyte species (Fig. 1). The lesions healed progressively until day 35 PI. The main clinical signs consisted of severe squamosis-crusting followed by transient alopecia. From day 11 PI until day 24 and 28 PI for *A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* respectively, median clinical scores were significantly higher in both infected groups in comparison with the controls (Fig. 2). The application of poloxamer 407 without fungus did not produce any lesions in the control group.

***A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* colonize keratinized skin structures**

To assess the presence and the localization of dermatophytes in keratinized skin structures of infected mice, skin biopsy sections were stained with PAS. In mice infected with both *A. vanbreuseghemii* and *A. benhamiae*, fungal elements consisting of both hyphae and arthroconidia were detectable from day 3 until day 14 PI in the *stratum corneum* and the keratinized part of the infundibular-isthmal hair follicles including the hair shafts. Subjectively, the most severe fungal colonization was observed at day 7 PI for both dermatophyte species (Fig. 3). As expected, no fungus elements were found in skin of control mice.

***A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* induce severe microscopic inflammatory skin lesions**

To assess histologic lesions in infected mice, skin biopsy sections were stained with H&E. All infected animals showed extensive inflammatory lesions. At day 3 PI, both dermatophytes induced a severe increase of epidermis thickness essentially due to both acanthosis (Figs. 4a, c) and hyperkeratosis, mainly orthokeratotic (Fig. 4a). These lesions were accompanied by moderate to severe multifocal to diffuse spongiosis (Fig. 4c) and by perivascular to diffuse dermal infiltration by immune cells (Fig. 4e). At 7 days PI, subcorneal pustules (Fig. 4d) were

also observed. By day 14 PI, lesions had disappeared in mice infected with *A. vanbreuseghemii*, while acanthosis, spongiosis and dermal cellular infiltration persisted beyond day 21 PI after infection with *A. benhamiae*. No lesions were observed in control mice (Fig. 4b).

Immune cells are recruited early after *A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* infection

To identify which immune cells were recruited to the infection site at day 7 PI, immunofluorescence staining was performed on frozen skin biopsy sections (Fig. 5). Large numbers of polymorphonuclear neutrophils (PMNs), MHC II expressing cells and to a lesser extent, dendritic cells (DCs) (CD11C+) and macrophages (CD54+) were recruited in the dermis of mice infected with both *A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii*. These cells were scarce in the skin of control mice.

Cytokine mRNA expression in infected skin

Cytokine mRNA levels were determined at days 7 and 21 PI and compared with those at day 0 (Fig. 6). Infection with both dermatophytes induced a statistically significant increase in the levels of TGF- β , IL-1 β and IL-6 mRNA at day 7 PI. The level of IL-22 mRNA was also significantly increased in mice infected with *A. benhamiae*. At day 21 PI, the levels of TGF- β , IL-1 β and IL-6 mRNA were significantly higher in mice infected with *A. benhamiae*, while infection with *A. vanbreuseghemii* induced a statistically significant increase in IL-1 β mRNA level only. The levels of cytokine mRNA in control non-infected mice were not significantly different at both days 7 and 21 PI in comparison to day 0.

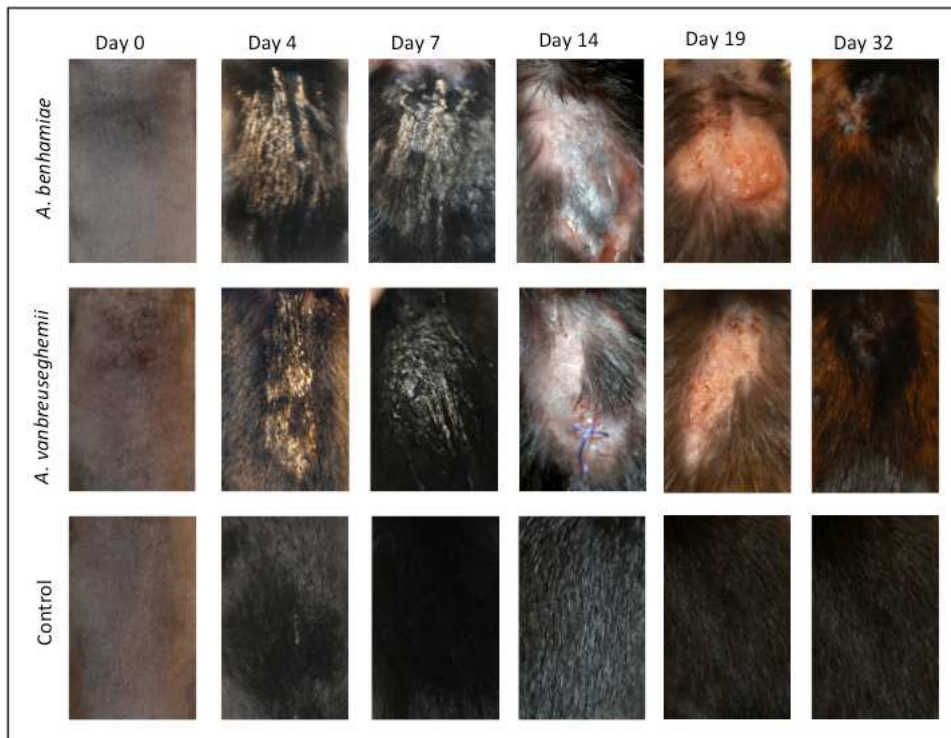


Fig. 1. Comparative clinical follow-up of skin lesions in mice inoculated with *Arthroderma benhamiae*, *Arthroderma vanbreusegheimii*, and the excipient (control). Both dermatophyte species induced comparable symptoms, which were obvious since day 4 post-infection (PI) and had spontaneously disappeared by day 32 PI. Macroscopic inflammatory skin lesions consisted of scaling and crusting followed by transient but severe inflammatory alopecia. Control mice developed no skin lesions

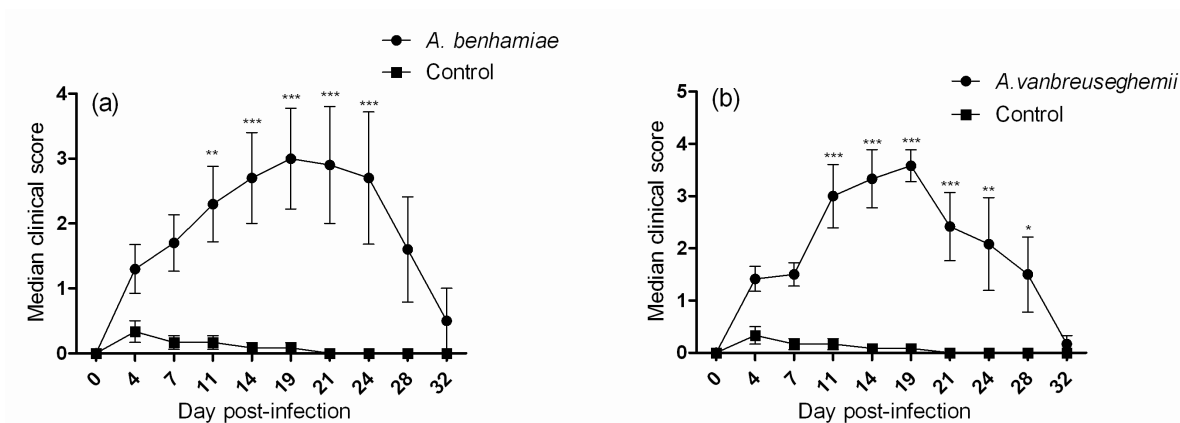


Fig. 2. Kinetics of median clinical scores (\pm SD) reflecting the severity of dermatophytic lesions in mice inoculated with *Arthroderma benhamiae* (a), *Arthroderma vanbreusegheimii* (b), and the excipient (control). Skin lesions were assessed blindly on the basis of clinical criteria, i.e., alopecia and squamosis-crusting. Median clinical scores were significantly different between the control group and the *A. benhamiae* group from day 11 until day 24 post-infection (PI). Significant differences were also observed between the control group and the *A. vanbreusegheimii* group from day 11 until day 28 PI. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

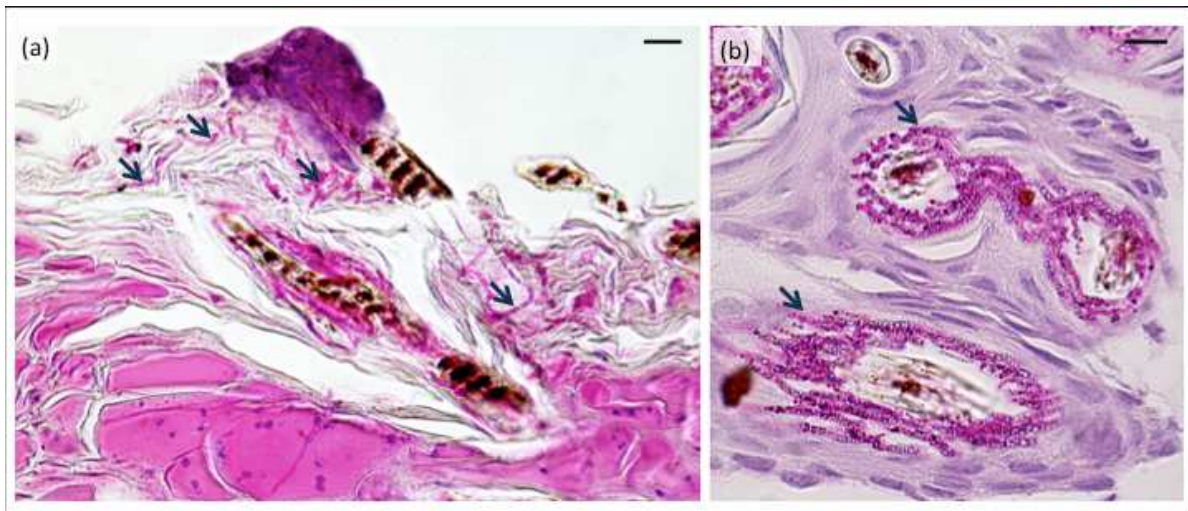


Fig. 3. Keratinized skin and follicular structures of infected mice are colonized after experimental inoculation with *Arthroderma benhamiae* and *Arthroderma vanbreuseghemii*. The fungal colonization in mice infected with *A. vanbreuseghemii* 7 days post-infection is shown. The *stratum corneum* (a) and hair follicles (b) were colonized by dermatophyte hyphae and arthroconidia (black arrows). Sections were stained with periodic acid-Schiff and counterstained with hematoxylin. Scale bars = 20 μ m.

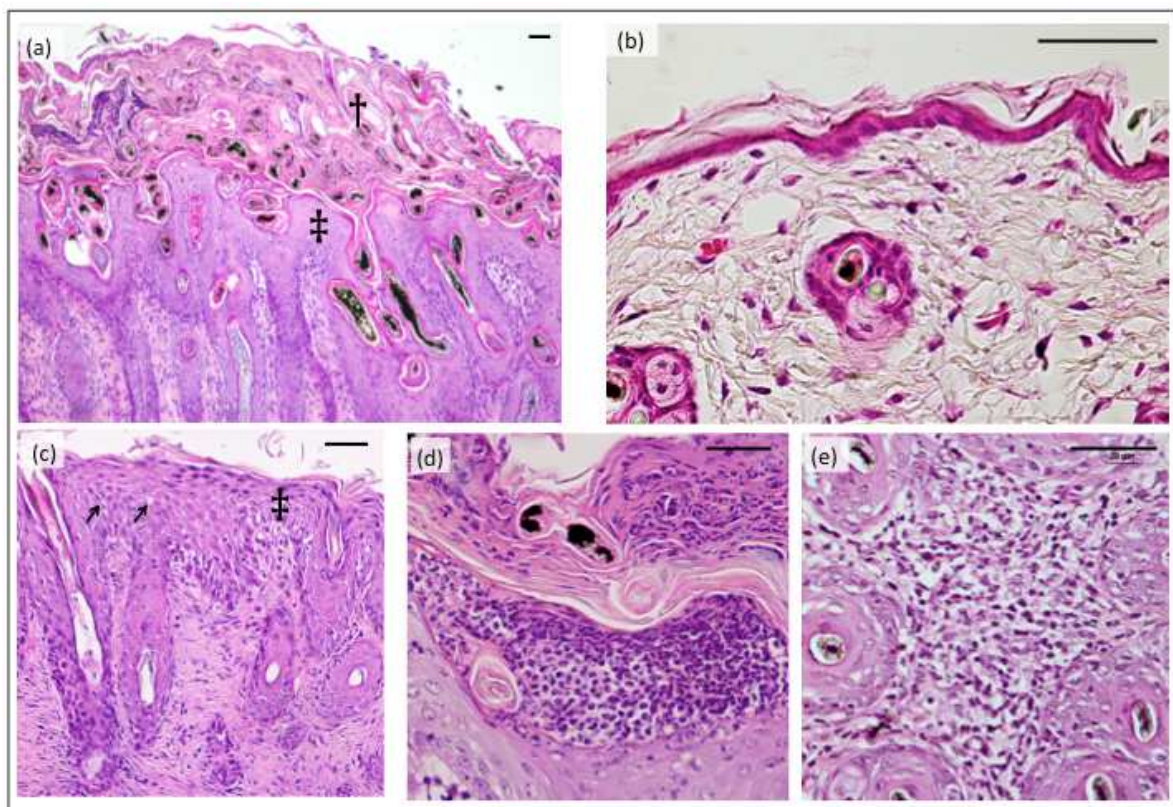


Fig. 4. : Mice infected with *Arthroderma benhamiae* (c) and *Arthroderma vanbreuseghemii* (a, d, e) develop comparable inflammatory epidermal and dermal lesions. Micrographs illustrate the main skin lesions consisting of severe acanthosis (a, c) and hyperkeratosis (a), accompanied by spongiosis (c), scattered subcorneal pustules (d), and perivascular-to-diffuse cellular infiltration in the dermis (e) at day 7 (a, b, d, e) and 21 post-infection (c). Control mice inoculated with the excipient (b) developed no skin lesions. Sections were stained with hematoxylin and eosin. †: hyperkeratosis, ‡: acanthosis, ↑: spongiosis. Scale bars = 20 μ m.

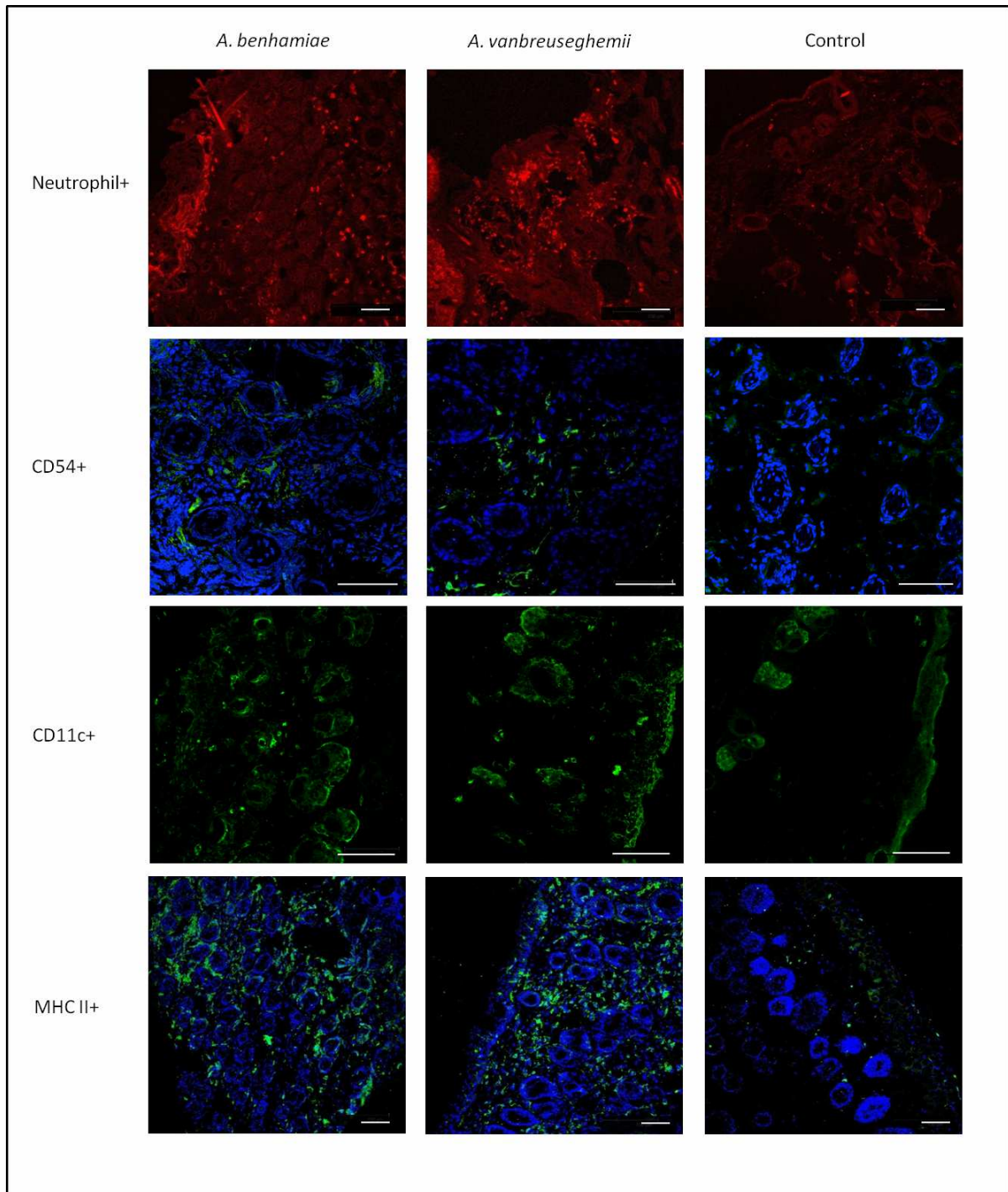


Fig. 5. Immune cells are recruited in the dermis of mice infected with both *Arthroderma benhamiae* and *Arthroderma vanbreuseghemii*. Micrographs show the connective tissue around the infundibular and isthmal hair follicles of infected mice at day 7 post-infection or uninfected controls. Immunofluorescence staining revealed that polymorphonuclear neutrophils (PMNs) (neutrophil+), class II major histocompatibility complex-expressing cells (MHC II+) and, to a lesser extent, dendritic cells (DCs) (CD11c+) and macrophages (CD54+) were recruited mainly around hair follicles. A fluorescent dye for nuclear staining, the TOPRO-3-iodide, was added to cryosections immunostained with anti-MHCII and anti-CD54 antibodies. Scale bars = 75 μ m.

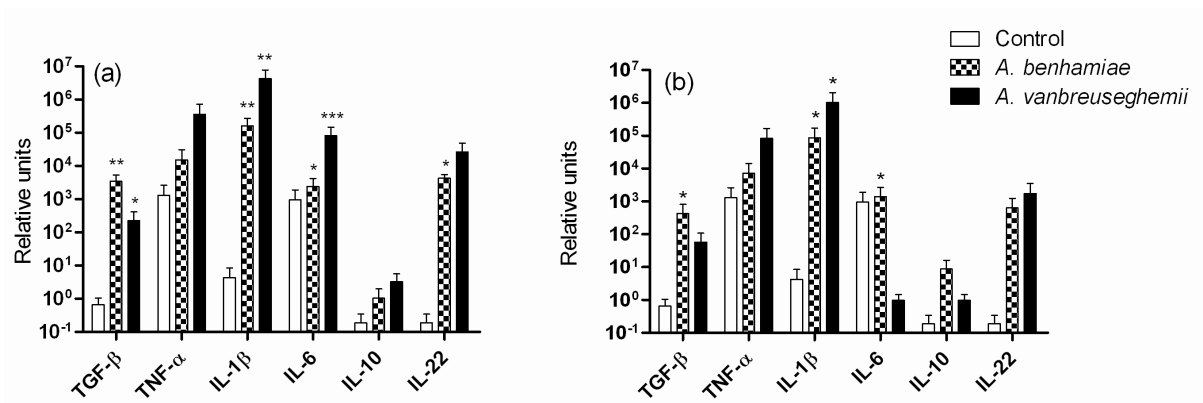


Fig. 6. Cytokine mRNA profile in the skin of mice at days 7 (a) and 21 (b) post-infection (PI) with *Arthroderma benhamiae* and *Arthroderma vanbreusegheimii*. In each group of mice, both uninfected control and infected, three animals were used to compare the levels of cytokine mRNAs before inoculation (day 0) and at days 7 and 21 PI. A statistically significant increase in TGF-β, IL-1β, IL-6, and IL-22 mRNA levels was observed in mice infected with *A. benhamiae* at day 7 PI. Similar results were observed in mice infected with *A. vanbreusegheimii*, except for levels of IL-22 mRNA, which were not significantly higher than at day 0. At day 21 PI, a statistically significant increase in TGF-β, IL-1β, and IL-6 mRNA was observed in mice infected with *A. benhamiae*. In mice infected with *A. vanbreusegheimii*, the increase in the levels of these cytokine mRNAs was statistically significant only for IL-1β. In uninfected control mice, the levels of cytokine mRNAs did not increase significantly through the study period. Data are representative of three independent experiments (mean ± SD). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Discussion

We have developed a new and useful experimental mouse model of dermatophytosis using either *A. benhamiae* or *A. vanbreusegheimii*. Both species were isolated from naturally infected humans in contact with rodents. For both dermatophytes, clinical signs were identical from one animal to another, typical for a primary natural infection and disappeared spontaneously, indicating that this model is reproducible and appears to be suitable for *in vivo* studies on acute dermatophytoses.

The symptoms and microscopic skin lesions, including the colonization of keratinized epidermal and follicular structures by both dermatophytes, were highly comparable to those described in a recent guinea pig infection model for *A. benhamiae*,²⁹ which was used to assess dermatophyte virulence factors *in vivo*.³⁰ A high amount of fungus was observed at day 7 PI in keratinized structures of mice infected with both dermatophytes before the peak of skin lesions (at day 19 PI). This observation is consistent with the recruitment of immune cells at day 7 PI that are responsible for elimination of the fungus by inducing an inflammatory response.

In contrast with guinea pig-based models,³⁷ one of the major advantages of our mouse model lies in the homogeneity of skin symptoms and lesions between individuals, thanks to the inbred nature of animals. Additional benefits include lower operating costs and availability of many modern immunological tools, which render relevant mouse models of dermatophytoses desirable for furthering a comprehensive understanding of the pathogenesis of these diseases.¹⁸

In addition to comparable clinical signs and microscopic inflammatory lesions, the nature of the immune cells recruited after the infection of mice with both *A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* was consistent with what most authors have observed using other models or during natural infections. The inflammatory response observed in skin of mice infected with both dermatophytes was characterized by an inflow of immune cells such as PMNs, macrophages and DCs. Similarly, the infiltration of skin by PMNs has been shown in experimentally infected mouse²⁰ and is commonly described as one of the histologic ‘clues’ to the diagnosis of dermatophytosis in humans.³⁸ Human PMNs and macrophages can exert cytotoxic activity against *Trichophyton* species including the most common dermatophyte *Trichophyton rubrum*, via phagocytosis and production of superoxide anions³⁹⁻⁴¹ and also via the formation of neutrophil extracellular traps (NETs).¹³

In addition to PMN and macrophages, our model also revealed infiltrating DCs, consistent with the role that these professional antigen presenting cells (APCs) are believed to play in the establishment of a protective immune response during dermatophytosis. Such a role is supported by *in vitro* experiments showing that both human DCs¹³ and several pattern recognition receptors on mouse DCs^{42, 43} can bind fungal components from both *T. rubrum* and *Microsporium andouinii*, and modulate immunity to dermatophytes. Additionally, cellular mediated immunity, which is known to be protective in dermatophytoses^{4, 5} is induced by the recognition of the MHC II at the APCs surface and the CD4+ T-cell receptor (TCR).⁴⁴ In this work, the considerable infiltration of MHC II expressing cells in the skin of infected mice suggests that these cells could be involved in the immunity against *A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii*. DCs and macrophages, both expressing MHC II on their surface⁴⁵ were recruited in the skin of mice infected with both dermatophytes, which suggests that these cells could be important for the initiation of immunity against dermatophytosis.

In order to investigate the cutaneous immune response in our validated dermatophytosis mouse model, parallel to the characterization of the cells recruited to the site of infection, we assessed the cytokine response *in situ*, precisely because the set-up of a protective immune response is also correlated with the establishment of an appropriate

cytokine response.⁴⁶ The cytokine profile generated by *A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* infection was a pro-inflammatory profile characterized by TGF- β , IL-1 β and IL-6 production. These cytokines are involved in the establishment of the Th17 pathway⁴⁷⁻⁴⁹. In mice infected with *A. benhamiae*, an increase in IL-22 mRNA level was also observed. This cytokine, which is also produced by Th17 cells,⁵⁰ has a significant role in the establishment of skin and mucosa immunity.⁵¹ Altogether, these results indicate that the Th17 pathway could be involved in the establishment of immunity against *A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii*. This hypothesis is strengthened by the weak IL-10 mRNA level produced in the skin of mice infected with both dermatophytes. This cytokine is known to reduce the inflammatory response by activating the Treg pathway.⁵² The potential role of the Th17 pathway in the immunity against *A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii* infection is also supported by the recruitment of PMNs to the site of infection, as cross-talk exists between Th17 cells and PMNs.⁵³⁻⁵⁶

In conclusion, we have developed and validated a new model of dermatophytosis in mice, which is consistent with former *in vivo* models, most of which are based on the guinea pig, a commonly used animal species that is not very suitable for studying this disease. Thanks to the inter-individual homogeneity of clinical signs and skin lesions, our model will be particularly useful for the evaluation of antifungals and vaccines, and for identifying dermatophyte virulence factors. Additionally, our model is consistent with the recent insights gained *in vitro* into the innate and specific immune response against dermatophytes. It appears to be, therefore, a promising modern animal model suitable to study, in depth, the host immune response in dermatophytosis. In the near future, the role of Th17 and the possible involvement of the Th1 or Th2 pathways in the initiation of a protective immunity against dermatophytes will be assessed by evaluating other pro-Th1, pro-Th2 and pro-Th17 cytokines in mice infected with *A. benhamiae* and *A. vanbreuseghemii*, as by using mice deficient for specific cytokines.

Acknowledgements

The authors thank Dr Vinciane Toppets, Jessica Collard and Joëlle Piret for technical assistance. They also thank Dr B. Evrard (Laboratory of Pharmaceutical Technology, University of Liège, Liège, Belgium) for providing the excipient.

References

- 1 Degreef H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). *Mycopathologia* 2008; **166**: 257-65.
- 2 Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 1995; **8**: 240-59.
- 3 Calderon RA. Immunoregulation of dermatophytosis. *Crit Rev Microbiol* 1989; **16**: 339-68.
- 4 Almeida SR. Immunology of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008; **166**: 277-83.
- 5 Mignon B, Tabart J, Baldo *et al.* Immunization and dermatophytes. *Curr Opin Infect Dis* 2008, **21**: 134-40.
- 6 Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* 2004; **190**: 624-31.
- 7 Bozza S, Zelante T, Moretti S, *et al.* Lack of Toll IL-1R8 exacerbates Th17 cell responses in fungal infection. *J Immunol* 2008; **180**: 4022-31.
- 8 Conti HR, Shen F, Nayyar N, *et al.* Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 2009; **206**: 299-311.
- 9 Zelante T, Luca Ad, Bonifazi P, *et al.* IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol* 2007; **37**: 2695-706.
- 10 Vermout S, Tabart J, Baldo A, *et al.* Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia* 2008; **166**: 267-75.
- 11 Shiraki Y, Ishibashi Y, Hiruma M, *et al.* Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *J Med Microbiol* 2006; **55**: 1175-85.
- 12 Cambier L, Mathy A, Baldo A, *et al.* Feline polymorphonuclear neutrophils produce pro-inflammatory cytokines following exposure to *Microsporum canis*. *Vet Microbiol* 2013, **162**: 800-5.
- 13 Heddergott C, Bruns S, Nietzsche S, *et al.* The *Arthroderma benhamiae* hydrophobin HypA mediates hydrophobicity and influences recognition by human immune effector cells. *Eukaryot Cell* 2012; **11**: 673-82.

- 14 Mignon BR, Leclipteux T, Focant C, *et al.* Humoral and cellular immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporium canis* in experimentally infected guinea pigs. *Med Mycol* 1999; **37**: 123-9.
- 15 Brouta F, Descamps F, Vermout S, *et al.* Humoral and cellular immune response to a *Microsporium canis* recombinant keratinolytic metalloprotease (r-MEP3) in experimentally infected guinea pigs. *Med Mycol* 2003; **41**: 495-501.
- 16 Saunte DM, Hasselby JP, Brillowska-Dabrowska A, *et al.* Experimental guinea pig model of dermatophytosis: A simple and useful tool for the evaluation of new diagnostics and antifungals. *Med Mycol* 2008; **46**: 303-13.
- 17 Baldo A, Mathy A, Tabart J, *et al.* Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporium canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. *Brit J Dermatol* 2010; **162**: 990-7.
- 18 White TC, Oliver BG, Gräser Y, Henn MR. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. *Eukaryot Cell* 2008; **7**: 1238-45.
- 19 Hay RJ, Calderon RA, Collins MJ. Experimental dermatophytosis: the clinical and histopathologic features of a mouse model using *Trichophyton quinckeanum* (mouse favus). *J Invest Dermatol* 1983; **81**: 270-4.
- 20 Hay RJ, Calderon RA, Mackenzie CD. Experimental dermatophytosis in mice: correlation between light and electron microscopic changes in primary, secondary and chronic infections. *Br J Exp Pathol* 1988; **69**: 703-16.
- 21 Calderon RA, Hay RJ. Cell-mediated immunity in experimental murine dermatophytosis. I. Temporal aspects of T-suppressor activity caused by *Trichophyton quinckeanum*. *Immunology*. 1984; **53**: 457-64.
- 22 Calderon RA, Hay RJ. Cell-mediated immunity in experimental murine dermatophytosis. II. Adoptive transfer of immunity to dermatophyte infection by lymphoid cells from donors with acute or chronic infections. *Immunology*. 1984; **53**: 465-72.
- 23 Beguin H, Pyck N, Hendrickx M, *et al.* The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited: a multigene phylogenetic approach. *Med Mycol*. 2012; **50**: 871-82.

- 24 Nakamura T, Nishibu A, Yasoshima M, *et al.* Analysis of *Trichophyton* antigen-induced contact hypersensitivity in mouse. *J Dermatol Sci* 2012; **66**: 144-53.
- 25 Venturini J, Álvares AM, Camargo MRd, *et al.* Dermatophyte-host relationship of a murine model of experimental invasive dermatophytosis. *Microbes Infect* 2012; **14**: 1144-51.
- 26 Drouot S, Mignon B, Fratti M, *et al.* Pets as the main source of two zoonotic species of the *Trichophyton mentagrophytes* complex in Switzerland, *Arthroderma vanbreuseghemii* and *Arthroderma benhamiae*. *Vet Dermatol* 2009; **20**: 13-8.
- 27 Symoens F, Jousson O, Planard C, *et al.* Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *Int J Med Microbiol* 2011; **301**: 260-6.
- 28 Symoens F, Jousson O, Packeu A, *et al.* The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: Intraspecies variability and mating behaviour. *J Med Microbiol* 2013; **62**: 377-85.
- 29 Staib P, Zaugg C, Mignon B, *et al.* Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* *in vitro* versus during infection. *Microbiology* 2010; **156**: 884-95.
- 30 Grumbt M, Defaweux V, Mignon B, *et al.* Targeted gene deletion and *in vivo* analysis of putative virulence gene function in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae*. *Eukaryot Cell* 2011; **10**: 842-53.
- 31 Alshahni MM, Yamada T, Takatori K, *et al.* Insights into a nonhomologous integration pathway in the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*: efficient targeted gene disruption by use of mutants lacking ligase IV. *Microbiol Immunol.* 2011; **55**: 34-43.
- 32 Hawksworth DL, Crous PW, Redhead SA, *et al.* The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus* 2011; **2**: 105-12.
- 33 Fumeaux J, Mock M, Ninet B, *et al.* First report of *Arthroderma benhamiae* in Switzerland. *Dermatology.* 2004; **208**: 244-50.
- 34 Shire D. An invitation to an open exchange of reagents and information useful for the measurements of cytokine mRNA levels by PCR. *Eur Cytokine Netw* 1993; **4**: 161-2.

- 35 Godinez I, Haneda T, Raffatellu M, *et al.* T cells help to amplify inflammatory responses induced by *Salmonella enterica* serotype typhimurium in the intestinal mucosa. *Infect Immun* 2008; **76**: 2008-17.
- 36 Dewals B, Hoving JC, Horsnell WGC *et al.* Control of *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation by IL-4-responsive CD4⁺CD25⁻CD103⁺Foxp3⁻ cells is IL-10-dependent. *Eur J Immunol* 2010; **40**: 2837-47.
- 37 Vermout SM, Brouta FD., Descamps FF *et al.* Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a *Microsporium canis* metalloprotease subunit vaccine in guinea pigs. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; **40**: 75-80.
- 38 Ackermann AB. Dermatophytosis. In: *Histology diagnosis of inflammatory skin diseases* (Ackerman AB, Chongchitnant N, Sanchez J, Guo J, Bennin B, Reichel M, Randall MB, eds), Williams & Wilkins: Baltimore, 1997; 910.
- 39 Calderon RA, Hay RJ. Fungicidal activity of human neutrophils and monocytes on dermatophyte fungi, *Trichophyton quinckeanum* and *Trichophyton rubrum*. *Immunology* 1987; **61**: 289-95.
- 40 Calderon RA, Shennan GI. Susceptibility of *Trichophyton quinckeanum* and *Trichophyton rubrum* to products of oxidative metabolism. *Immunology* 1987; **61**: 283-8.
- 41 Dahl MV, Carpenter R. Polymorphonuclear leukocytes, complement, and *Trichophyton rubrum*. *J Invest Dermatol* 1986; **86**: 138-41.
- 42 Chung JS, Yudate T, Tomihari M, *et al.* Binding of DC-HIL to dermatophytic fungi induces tyrosine phosphorylation and potentiates antigen presenting cell function. *J Immunol* 2009; **183**: 5190-8.
- 43 Sato K, Yang XL, Yudate T, *et al.* Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem* 2006; **281**: 38854-66.
- 44 Joffre O, Nolte MA, Sporri R, Sousa CRE. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009; **227**: 234-47.
- 45 Bryant P, Ploegh H. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr Opin Immunol* 2004; **16**: 96-102.

- 46 Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J Invest Dermatol* 2005; **125**: 615-28.
- 47 Bettelli E, Carrier YJ, Gao WD, *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T(H)17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; **441**: 235-8.
- 48 Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, *et al.* Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007; **8**: 950-7.
- 49 Volpe E, Servant N, Zollinger R, *et al.* A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol* 2008; **9**: 650-7.
- 50 Stockinger B, Veldhoen M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr Opin Immunol* 2007; **19**: 281-6.
- 51 Wolk K, Kunz S, Witte E, *et al.* IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004; **21**: 241-54.
- 52 Sabat R, Grutz G, Warszawska K, *et al.* Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev* 2010; **21**: 331-44.
- 53 Pelletier M, Maggi L, Micheletti A, *et al.* Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood* 2010; **115**: 335-43.
- 54 Roussel L, Houle F, Chan C, *et al.* IL-17 promotes p38 MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *J Immunol* 2010; **184**: 4531-7.
- 55 Griffin GK, Newton G, Tarrío ML, *et al.* IL-17 and TNF-alpha sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J Immunol* 2012; **188**: 6287-99.
- 56 Hsu SC, Wang LT, Yao CL, *et al.* Mesenchymal stem cells promote neutrophil activation by inducing IL-17 production in CD4⁺ CD45RO⁺ T cells. *Immunobiology* 2013; **218**: 90-5.

CHAPITRE 5

Discussion générale et perspectives

Ce travail de thèse s'inscrit dans le contexte général de l'étude de la mise en place de la réponse immune anti-dermatophytes. L'immunologie des dermatophytoses est actuellement encore peu connue. Il est couramment admis qu'une réponse immune à médiation cellulaire est requise pour le contrôle de l'infection et l'élimination du dermatophyte tandis qu'une réponse humorale serait non protectrice (Almeida, 2008 ; Mignon *et al.*, 2008). En effet, le transfert de lymphocytes T d'une souris infectée par *T. quinckeanum* à une souris naïve protège cette dernière contre l'infection alors que le transfert de sérum n'a aucun effet (Calderon et Hay, 1984b). Il semblerait que la réponse cellulaire efficace lors d'une dermatophytose est de type Th1 et est associée à une réaction cutanée d'hypersensibilité retardée (Lund *et al.*, 2001 ; Almeida, 2008 ; Mignon *et al.*, 2008). Cependant, le rôle des lymphocytes Th17 dans la mise en place d'une réponse immune protectrice anti-dermatophytes ne doit pas être négligé. En effet, il a été démontré que la voie Th17 est impliquée dans la réponse immune produite au cours de nombreuses maladies fongiques (Bozza *et al.*, 2008 ; Romani *et al.*, 2008 ; Zelante *et al.*, 2009 ; Gaffen *et al.*, 2009 ; Saijo *et al.*, 2010). De plus, en réponse au dermatophyte *A. benhamiae*, le profil cytokinique généré par des kératinocytes humains stimulés *in vitro* par le champignon indique que la voie Th17, plus que la voie Th1, pourrait être impliquée dans la mise en place de la réponse immune protectrice (Shiraki *et al.*, 2006). Le flou persiste donc quant aux mécanismes impliqués dans l'établissement d'une réponse immune anti-dermatophytes. L'étude de l'immunité innée et de l'immunité adaptative doit donc être investiguée plus en profondeur, pour permettre, *in fine*, la mise au point de vaccins sûrs et efficaces contre les dermatophytoses tant chez l'animal que chez l'homme.

L'objectif général de ce travail de thèse était de contribuer à l'étude de la réponse immune anti-dermatophytes en étudiant les mécanismes impliqués dans l'établissement de l'immunité anti-*M. canis* et en développant un modèle murin de dermatophytose superficielle. Pour ce faire, ce travail a été divisé en trois parties. La première étude a été consacrée au rôle des PMN félins dans l'établissement de la réponse immune anti-*M. canis* ; la deuxième a porté sur l'évaluation des propriétés protectrices d'un constituant sécrété de *M. canis* nommé SNI dans un essai vaccinal réalisé chez le cobaye ; la troisième consistait à développer un modèle murin de dermatophytose pour évaluer la réponse immune générée au cours de l'infection.

Les résultats obtenus dans la première étude ont démontré que les PMN félins produisent du TNF- α , de l'IL-1 β et de l'IL-8, qui sont toutes trois des cytokines pro-inflammatoires, lorsqu'ils sont exposés à des arthrospores vivantes de *M. canis* ainsi qu'à des

constituants structuraux, représentés par des arthrospores tuées par la chaleur, et sécrétés, constitués par le SNI. Il a été suggéré par d'autres auteurs que les PMN jouent un rôle important dans la protection en produisant des cytokines pro-inflammatoires dans certaines maladies fongiques. Ainsi, Schaller et collaborateurs (2004) ont démontré, en utilisant un modèle *in vitro* de candidose orale, que l'ajout de PMN à l'épithélium humain induit la production d'IL-1 α , IL-1 β , TNF- α et IL-8. Une autre étude a démontré que ces cellules produisent de l'IL-8 lorsqu'elles sont stimulées *in vitro* par *P. brasiliensis* (Acorci-Valério *et al.*, 2010). D'autres auteurs ont également montré que la levure *C. albicans*, lorsqu'elle est inactivée par la chaleur, induit la production de TNF- α , IL-1 β et IL-8 par les PMN chez l'homme (Saegusa *et al.*, 2009). Enfin le rôle des composants sécrétés dans l'activation des PMN a été démontré pour des agents pathogènes fongiques comme *C. albicans* (Losse *et al.*, 2011) et bactériens tels *Trichomonas vaginalis* (Nam *et al.*, 2012). Nos résultats, qui indiquent que les composants sécrétés de *M. canis* représentés par le SNI stimulent les PMN félines, sont donc comparables à ceux observés dans d'autres phénomènes infectieux. Nous avons également montré que Sub6 de *M. canis*, un constituant sécrété caractérisé, n'est pas capable d'induire la production de cytokines pro-inflammatoires par les PMN félines. Cette protéase qui est peu exprimée *in vitro* mais fortement *in vivo* (Mathy, 2012), y compris chez d'autres dermatophytes comme *A. benhamiae* (Staib *et al.*, 2010), pourrait intervenir dans les mécanismes d'immuno-évasion comme cela a été démontré pour d'autres agents pathogènes. Ainsi, au cours d'une infection à *Coccidioides posadasii*, un champignon pathogène entraînant des maladies respiratoires graves chez l'homme, le champignon sécrète la métalloprotéase 1 lors de la différenciation des endospores. Cette protéase joue un rôle majeur dans la pathogénèse de l'infection. Elle est utilisée par le champignon pour échapper à la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte et permet donc l'établissement d'une infection persistante (Hung *et al.*, 2005). Une autre étude a également démontré qu'une métalloprotéase de la bactérie *Tannerella forsythia*, impliquée dans les maladies parodontales, en inhibant l'activité bactéricide du peptide antimicrobien LL-37, joue un rôle important dans l'immuno-évasion et contribue au développement d'une réponse inflammatoire chronique (Koziel *et al.*, 2010). Nos résultats indiquent donc que les PMN produisent des cytokines pro-inflammatoires lorsqu'ils sont stimulés *in vitro* par *M. canis* et que les composants fongiques responsables de cette activation sont de nature structurelle et sécrétée, mais n'incluent pas la protéase Sub6. Pour vérifier le rôle potentiel des PMN félines *in vivo* dans la protection au cours d'une dermatophytose à *M. canis*, un modèle sur souris devrait être développé. En effet,

l'utilisation de souris neutropéniques permettrait d'évaluer rapidement et efficacement le rôle des PMN dans la mise en place d'une réponse immune protectrice au cours d'une infection.

L'évaluation de la production de cytokines par les PMN félines a été réalisée par ELISA ainsi que par PCR quantitative. L'interprétation des résultats obtenus par qRT-PCR s'est avérée délicate. En effet, à part une augmentation significative pour l'IL-8, le taux d'ARNm des autres cytokines n'a pas varié de manière importante. Les trousse ELISA disponibles dans l'espèce féline étant restreintes, seules les cytokines TNF- α et IL-8 ont été étudiées par ELISA et par qRT-PCR. La sécrétion importante de TNF- α détectée par ELISA n'était pas corrélée au taux d'expression d'ARNm. Ce résultat est surprenant mais des observations similaires ont été rapportées dans d'autres études (Sawant et McMurray, 2007 ; Saegusa *et al.*, 2009). Les PMN matures pourraient être totalement différenciés et ne seraient donc plus capables de modifier leur taux d'expression génique suite à des modifications environnementales. Néanmoins, plusieurs études ont démontré que les PMN étaient capables de réguler leur expression génique lorsqu'ils sont stimulés par des agents pathogènes (Fradin *et al.*, 2007 ; Ma *et al.*, 2011). C'est également le cas dans notre étude qui indique que le taux d'ARNm en TNF- α augmente de manière significative dans les PMN exposés au LPS. La différence observée entre les résultats obtenus par ELISA et par qRT-PCR pourrait être liée à la courte demi-vie des PMN en culture ou, plus probablement, à la faible quantité d'ARN qu'ils contiennent en raison de leur teneur élevée en chromatine dense (hétérochromatine) (Dockrell *et al.*, 2007). En effet, l'euchromatine, peu dense, contient de l'ADN actif et c'est elle qui permet l'expression génique tandis que l'hétérochromatine contient de l'ADN principalement inactif qui servirait à des fins structurales durant les phases chromosomiques (Olins et Olins, 2003). Dès lors, malgré la sensibilité élevée de la trousse commerciale utilisée, la quantité d'ARN total isolé des PMN félines pourrait être insuffisante pour détecter une augmentation faible mais significative du taux d'ARNm du TNF- α en réponse à la stimulation par *M. canis*.

Les résultats obtenus dans la première partie de cette étude ont donc démontré que les PMN félines sont capables de produire des cytokines pro-inflammatoires en réponse à la stimulation par *M. canis*. Cette activation fait suite à la reconnaissance de PAMP du champignon par les PRR des PMN (Kumagai *et al.*, 2008). Nous nous sommes donc intéressés, dans la deuxième partie de cette étude, aux PRR des PMN qui pouvaient être impliqués dans la reconnaissance des constituants de *M. canis*. Seuls les TLR-2, TLR-4 et la dectine-1 ont été testés car, selon la littérature, ils sont plus souvent impliqués que d'autres récepteurs dans la mise en place de l'immunité antifongique (Balloy *et al.*, 2005 ; Weindl *et*

al., 2007 ; Bonfim *et al.*, 2009 ; Skrzypek *et al.*, 2009 ; Acorci-Valério *et al.*, 2010 ; Saijo et Iwakura, 2011). D'après les résultats préliminaires que nous avons obtenus, les TLR-2 et TLR-4 des PMN félines pourraient être impliqués dans la reconnaissance des arthrospores vivantes et tuées de *M. canis* ainsi que des protéases Sub3 et Sub6. En effet, une augmentation significative des taux d'expression des TLR-2 et 4 a été observée dans les PMN stimulés par ces constituants fongiques. Néanmoins, pour affirmer que ces récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance des PAMP de *M. canis*, il faudrait réaliser des études complémentaires, en particulier l'évaluation de la production de cytokines pro-inflammatoires par les PMN après blocage du TLR-2 et du TLR-4 par des anticorps. L'utilisation de souris KO (*knockout*) pour ces récepteurs permettrait également de vérifier leur implication dans l'immunité anti-*M. canis*. Des résultats antérieurs menés dans notre laboratoire ont démontré que les kératinocytes félines stimulés par les arthrospores vivantes ainsi que différents constituants fongiques produisent des cytokines pro-inflammatoires telles le TNF- α , l'IL-1 β et l'IL-18 (Tabart, 2008). Les TLR-2 et TLR-4 des kératinocytes félines, qui sont les premières cellules rencontrées par le champignon au cours d'une infection, pourraient eux aussi intervenir dans la reconnaissance des PAMP de *M. canis*. Le rôle des TLR des kératinocytes dans l'immunité anti-*M. canis* devrait également être investigué.

A l'issue des résultats obtenus pour cette première étude, un schéma des mécanismes hypothétiques impliqués dans l'activation des PMN félines au cours d'une dermatophytose à *M. canis* a pu être établi (Figure 17). Les arthrospores vivantes de *M. canis*, représentant les éléments infectieux, ainsi que les composés structuraux, représentés par les arthrospores tuées par la chaleur, seraient reconnus par les PMN félines via les récepteurs TLR-2 et TLR-4. Cela induirait la stimulation de la voie MyD88 puis du facteur de transcription NF κ B et aboutirait à la production de cytokines pro-inflammatoires. Les protéases sécrétées Sub6 et Sub3 seraient également reconnues par les PMN félines via les récepteurs TLR-2 et TLR-4, conduisant cependant à l'inhibition de l'activation de la voie MyD88 et la production de cytokines pro-inflammatoires. Ces protéases pourraient être impliquées dans des mécanismes d'immuno-évasion. Le SNI de *M. canis*, un constituant sécrété fongique, induit la production de cytokines pro-inflammatoires par les PMN félines mais il ne serait pas reconnu par les récepteurs TLR-2 et TLR-4. Il pourrait être reconnu par d'autres récepteurs de surface appartenant à la famille des TLR (TLR-1, TLR-5, TLR-6) ou à la famille des CLR (Dectine-2, DC-SIGN). Les récepteurs membranaires intracytoplasmiques tels le TLR-8 et le TLR-9 pourraient également être impliqués dans la reconnaissance du SNI.

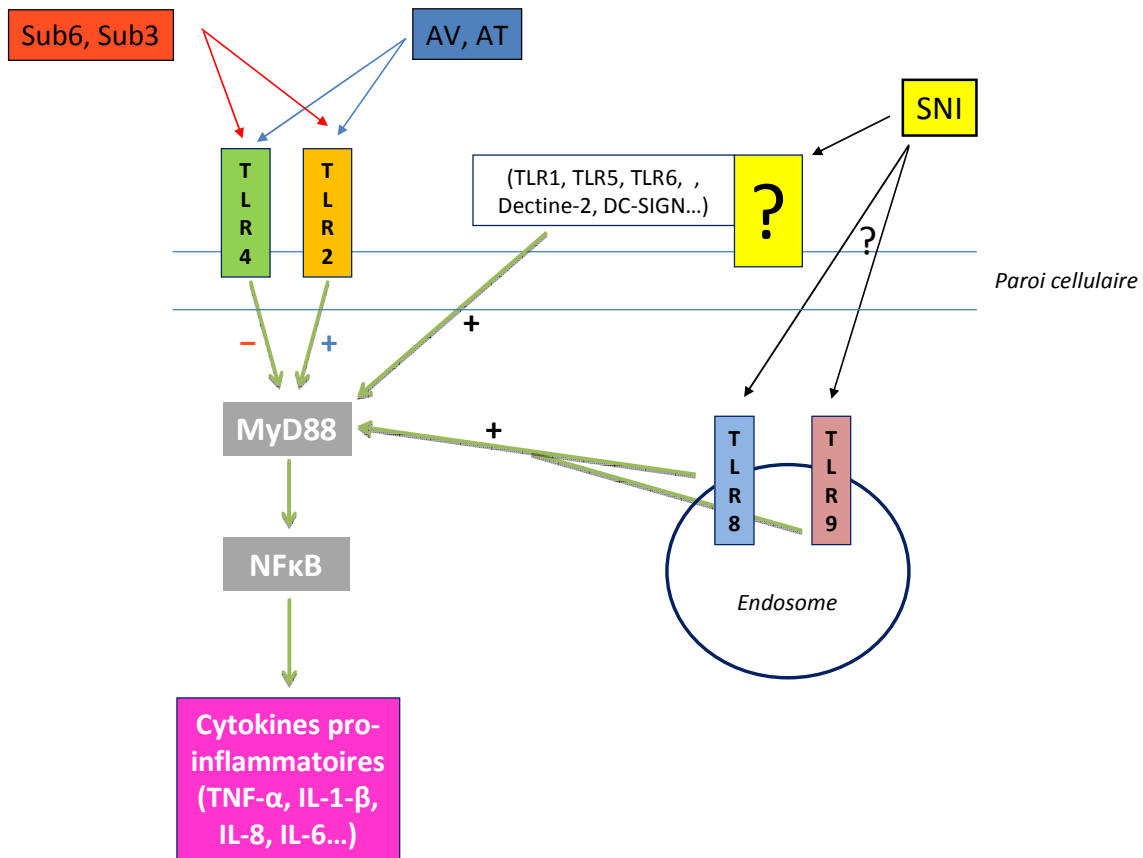


Figure 17. Mécanismes hypothétiques impliqués dans l’activation des PMN félines au cours d’une dermatophytose à *Microsporum canis*.
 AV : arthrospores vivantes ; AT : arthrospores tuées ; TLR : toll like receptor ; MyD88 : myeloid differentiation factor 88 ; NFκB ; nuclear factor-kappa B ; DC-SIGN : dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3 grabbing non-integrin ; SNI : surnageant non induit

L’objectif de la deuxième étude de ce mémoire était d’évaluer les propriétés protectrices du SNI de *M. canis* couplé à l’adjuvant MPLA, dans un essai vaccinal utilisant le cobaye comme animal expérimental. Les résultats obtenus ont montré que la vaccination avec le SNI couplé au MPLA ne confère pas de protection après une infection expérimentale et ne permet pas aux animaux vaccinés de guérir plus vite que les animaux non vaccinés ayant reçu uniquement le MPLA. Cependant, les résultats ont également démontré que les cobayes traités préalablement avec l’adjuvant MPLA développent significativement moins de signes

cliniques que les cobayes ayant reçu du PBS. Le MPLA utilisé dans notre essai vaccinal semble donc avoir un effet protecteur partiel au cours d'une infection expérimentale par *M. canis*. Le MPLA est un dérivé non toxique de la région « *lipid A* » du LPS qui est reconnu par le récepteur TLR-4 (Johnson *et al.*, 1987). La stimulation du récepteur TLR-4 induit, comme cela a été décrit précédemment dans l'introduction (cf. 2.3), *in fine* la production de cytokines pro-inflammatoires qui pourraient limiter l'invasion des structures kératinisées par *M. canis*. Il a été démontré que le MPLA intervient dans l'établissement d'une réponse immune innée en augmentant le nombre de cellules phagocytaires sur le site d'infection au cours d'une infection bactérienne (Romero *et al.*, 2011). De plus, il semble également impliqué dans la mise en place de l'immunité adaptative en favorisant la différenciation des lymphocytes CD4+ en lymphocytes de type Th1 produisant de l'IFN- γ (Thompson *et al.*, 2005). Au cours d'une dermatophytose, il est couramment admis que la réponse immune protectrice est une réponse cellulaire de type Th1 associée à une DTH (Almeida, 2008 ; Lund et Deboer, 2008 ; Mignon *et al.*, 2008). Il peut dès lors être envisagé que l'adjuvant MPLA utilisé dans cette expérience de vaccination stimule la voie Th1 et contribue à l'établissement d'une protection partielle au cours d'une dermatophytose à *M. canis*. Pour tester son rôle dans la mise place d'une immunité protectrice, des expériences *in vitro* et *in vivo* plus approfondies devraient être entreprises. Des tests de stimulation de lymphocytes T par *M. canis*, préalablement stimulés ou non avec du MPLA, permettraient de déterminer le profil cytokinique généré et d'évaluer la prolifération lymphocytaire induite. D'autres expériences *in vivo* pourraient également être réalisées. Le MPLA pourrait être utilisé pour stimuler le système immunitaire de cobayes juste avant une infection expérimentale à *M. canis*. L'effet protecteur ou non du MPLA serait alors déterminé par l'établissement d'un suivi clinique et histopathologique des lésions ainsi que par l'analyse du profil cytokinique et de la capacité de prolifération des lymphocytes T isolés des ganglions drainants.

Les résultats obtenus dans cette deuxième étude ont également montré que bien qu'il produise des DTH chez le cobaye ayant surmonté une infection expérimentale (Tabart, 2008), le SNI n'est pas protecteur dans les conditions de notre essai. Une explication possible est que le SNI est constitué d'un ensemble d'antigènes sécrétés fongiques et que, parmi ceux-ci, certains pourraient moduler la réponse immune et permettre au champignon de survivre à l'intérieur des cellules immunitaires. Un tel phénomène a déjà été décrit pour un autre dermatophyte, *T. rubrum*, qui est capable de croître à l'intérieur des macrophages après avoir été phagocyté (Campos *et al.*, 2006). Par conséquent, la caractérisation et la sélection d'antigènes protecteurs du SNI doivent être réalisées pour permettre le développement d'un

vaccin efficace contre la dermatophytose à *M. canis*. De plus, le génome de *M. canis* étant publié,

(http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/dermatophyte_comparative/Regions.html), de nouvelles protéases ont pu être identifiées (Sriranganadane *et al.*, 2011) et pourront être ultérieurement caractérisées et utilisées comme candidat vaccinal.

Dans cette expérience de vaccination, nous avons remarqué que les lésions cutanées développées par les cobayes infectés n'étaient pas homogènes d'un animal à l'autre au sein d'un même groupe. Cela a également été observé précédemment dans un autre essai vaccinal réalisé dans notre laboratoire (Vermout *et al.*, 2004). De plus, les écarts-types importants mesurés à partir des données obtenues pour les tests de quantification cytokinique, dans les lymphocytes T restimulés par le SNI ou les arthrospores tuées de *M. canis*, indiquent que le cobaye n'est peut-être pas l'espèce animale idéale pour l'étude de la réponse immune au cours d'une dermatophytose, bien qu'il soit le modèle animal le plus souvent utilisé pour l'étude de ces infections (Mignon *et al.*, 1999b ; Descamps *et al.*, 2003b ; Vermout *et al.*, 2004 ; Saunte *et al.*, 2008 ; Baldo *et al.*, 2010 ; Staib *et al.*, 2010 ; Grumbt *et al.*, 2011). Le caractère non consanguin de cette espèce est sans doute à l'origine de la grande variabilité interindividuelle observée dans notre expérience de vaccination. En outre, son coût relativement important et le manque d'outils génétiques et immunologiques disponibles chez cette espèce plaident pour l'utilisation d'un autre modèle animal. Le caractère consanguin, le faible coût, ainsi que la grande variété d'outils disponibles chez la souris en font à priori un modèle idéal pour l'étude de la pathogenèse des dermatophytoses (White *et al.*, 2008). L'établissement d'un modèle murin de dermatophytose est donc fortement souhaitable. Concernant *M. canis*, l'utilisation de souris déficientes en TLR-4 permettrait d'évaluer finement le rôle de ce récepteur dans l'immunité antifongique.

Suite aux résultats obtenus dans la deuxième étude, la troisième partie de cette thèse s'est naturellement concentrée sur l'établissement d'un modèle murin de dermatophytose. Les dermatophytes utilisés dans cette expérience étaient *M. canis*, principal dermatophyte étudié dans notre laboratoire et dont l'hôte naturel est le chat (Pier et Moriello, 1998), *A. benhamiae* affectant principalement les cobayes, et *A. vanbreuseghemii* responsable de dermatophytose chez le chat et le chien principalement (Drouot *et al.*, 2009). Nous avons mis au point un modèle murin de dermatophytose à *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii* utile et reproductible. En effet, les signes cliniques développés par les souris infectées par ces deux dermatophytes étaient homogènes d'un individu à l'autre, représentatifs d'une infection

naturelle et disparaissaient spontanément. Concernant les souris infectées par *M. canis*, 40 % d'entre elles seulement présentaient des symptômes de dermatophytose. De plus, les lésions cutanées étaient très discrètes par comparaison avec celles développées par les souris infectées par *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii*. Notre modèle murin, tel quel, n'est donc pas au point pour une infection à *M. canis* et nécessite des adaptations. Une immunodépression transitoire, à l'aide de glucocorticoïdes, permettrait peut-être de favoriser le déclenchement de l'infection par *M. canis*. Cette technique a déjà été utilisée pour établir des modèles d'infections fongiques à *C. albicans* (Mosci *et al.*, 2013) et *Aspergillus terreus* (Slesiona *et al.*, 2012). Dans notre modèle murin, nous avons effectué une infection expérimentale se rapprochant le plus possible d'une infection naturelle, mais le recours à des subterfuges favorisant l'établissement d'une infection est parfois indispensable.

Les résultats obtenus pour l'infection expérimentale par *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii* ont montré que ces deux dermatophytes induisent des lésions cutanées inflammatoires et colonisent les structures kératinisées de l'épiderme et des follicules pileux, ce qui est comparable à ce que Staib et collaborateurs (2010) ont observé chez des cobayes infectés expérimentalement par *A. benhamiae*. L'avantage majeur de notre modèle murin consiste en l'homogénéité des symptômes cutanés observés entre les animaux infectés, contrairement à ce qui est observé chez le cobaye (Vermout *et al.*, 2004).

En plus d'avoir établi un modèle murin de dermatophytose induisant des lésions macro-et microscopiques comparables à celles observées lors d'une infection naturelle, nous avons évalué la nature des cellules immunes recrutées sur le site d'infection. Les marquages immunofluorescents réalisés sur les biopsies de peau de souris infectées par les deux dermatophytes ont mis en évidence un recrutement important de PMN ainsi que, dans une moindre mesure, de macrophages et de DC. Dans un modèle d'infection à *T. quinckeanum*, les PMN sont également recrutés en grand nombre dans la peau de souris infectées expérimentalement. De plus, la présence de PMN au site d'infection constitue un indice histologique majeur dans le diagnostic des dermatophytoses chez l'homme (Ackerman, 1997). Ces cellules pourraient donc jouer un rôle non négligeable dans la mise en place d'une réponse immune lors d'infections à *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii*. Au cours des dermatophytoses provoquées par *T. rubrum* et *T. quinckeanum*, les PMN, ainsi que les macrophages, jouent un rôle important dans l'immunité via la phagocytose et la production d'ions superoxydes (Calderon et Hay, 1987 ; Calderon et Shennan, 1987). Plus récemment, il a été démontré *in vitro* qu'*A. benhamiae* induit la formation du NET par les PMN, qui

constitue un troisième mécanisme de défense mis en place par ces cellules (Heddergott *et al.*, 2012).

En plus des PMN et des macrophages, les résultats obtenus ont démontré que les DC sont recrutées dans la peau des souris infectées par *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii*. Ces cellules, dont le principal rôle est de présenter l'antigène aux lymphocytes T, sont impliquées dans la mise en place d'une réponse immune protectrice au cours d'une dermatophytose. En effet, lorsqu'elles sont stimulées par *A. benhamiae*, les DC produisent des cytokines pro-inflammatoires (Heddergott *et al.*, 2012). Ces cellules, ainsi que les cellules de Langerhans, expriment un PRR spécifique, le DC-HIL (Shikano *et al.*, 2001), qui leur permet de reconnaître des composants fongiques de *T. rubrum* et de *Microsporum audouinii* (Chung *et al.*, 2009). La mise en évidence de ces cellules dans la peau au cours d'une infection expérimentale à *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii* suggère que les DC pourraient intervenir dans l'établissement d'une réponse immune adaptative en stimulant les lymphocytes T via leur CMH II. Nous avons démontré que de nombreuses cellules exprimant le CMH II sont recrutées dans la peau des souris infectées par les deux dermatophytes. Les DC, ainsi que les macrophages, tous deux exprimant le CMH II à leur surface (Bryant et Ploegh, 2004), sont recrutés dans la peau des souris infectées par *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii*. Ces résultats indiquent que ces cellules pourraient avoir un rôle essentiel dans l'établissement d'une réponse immune anti-dermatophytes.

Afin d'évaluer la nature de la réponse immune générée au cours de l'infection expérimentale, nous avons mesuré le taux d'ARNm de différentes cytokines produites dans la peau des souris infectées. Le profil cytokinique généré suite à l'infection par les deux dermatophytes est un profil pro-inflammatoire caractérisé par la production de TGF- β , IL-1 β et IL-6. Ces cytokines sont impliquées dans l'établissement de la voie Th17. Plus précisément, chez la souris, la voie Th17 est induite par le TGF- β et l'IL-6 (Bettelli *et al.*, 2006) tandis que chez l'homme, le TGF- β , l'IL-1 β , l'IL-6 ainsi que l'IL-23 interviennent dans l'établissement de cette voie (Wilson *et al.*, 2007 ; Volpe *et al.*, 2008). En outre, le taux d'ARNm de l'IL-22 est également augmenté chez les souris infectées par les deux dermatophytes. Cette cytokine, qui est produite par les lymphocytes Th17 (Stockinger et Veldhoen, 2007), joue un rôle majeur dans l'établissement de l'immunité de la peau et des muqueuses (Wolk *et al.*, 2004). L'ensemble de ces résultats indique que la voie Th17 est probablement impliquée dans la mise en place d'une immunité protectrice au cours d'une dermatophytose à *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii*. Cependant, il a été récemment démontré chez l'homme, l'existence d'une quatrième sous-population de lymphocytes T

helper produisant de l'IL-22 mais pas d'IL-17 ni d'IFN- γ (Duhen *et al.*, 2009 ; Eyerich *et al.*, 2009 ; Trifari *et al.*, 2009). La voie Th22, que ces cellules représenteraient, pourrait également intervenir dans l'immunité anti-dermatophytes. Néanmoins, l'existence de cette voie n'est pas encore clairement établie aujourd'hui et l'avis des scientifiques diverge sur ce sujet. Nous considérerons dans notre travail que l'IL-22 est associée à la voie Th17 qui aurait un rôle prépondérant dans l'établissement de l'immunité anti-dermatophytes au cours d'une infection à *A. benhamiae* ou *A. vanbreuseghemii*. Cette hypothèse est renforcée par le faible taux d'ARNm de l'IL-10 produit dans la peau des souris infectées. En effet, cette cytokine diminue la réponse inflammatoire en activant les cellules Treg (Sabat *et al.*, 2010). Enfin, le recrutement important de PMN dans les lésions des souris infectées par les deux dermatophytes renforce également cette théorie. De nombreuses recherches démontrent les liens étroits qui existent entre les PMN et les cellules Th17 (Roussel *et al.*, 2010 ; Griffin *et al.*, 2012 ; Hsu *et al.*, 2013). Plus particulièrement, les lymphocytes Th17 peuvent attirer les PMN au site d'infection directement en produisant de l'IL-8 ou de manière indirecte via la production d'IL-17A et d'IL-17F. Ces deux cytokines induisent l'expression de médiateurs pro-inflammatoires tels l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, le TNF- α , le G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) et le GM-CSF (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*), qui recrutent et activent les PMN (Pelletier *et al.*, 2010).

Le profil cytokinique ainsi que les cellules immunes recrutées sur le site d'infection nous permettent donc d'envisager que la voie Th17 interviendrait dans l'établissement d'une réponse immune protectrice au cours d'une dermatophytose à *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii*. Pour vérifier cette hypothèse, l'expression d'autres cytokines pro-Th1 (IFN- γ , IL-12p35), pro-Th2 (IL-4, IL-5) ou encore pro-Th17 (IL-17, IL-23) devrait être évaluée dans la peau des souris infectées ou dans les ganglions drainant la peau. La caractérisation du profil cytokinique et ainsi la mise en évidence de la voie impliquée dans la réponse immune protectrice à l'égard des différents dermatophytes permettraient de contribuer à la mise au point d'un vaccin efficace en choisissant de manière plus pertinente l'adjuvant approprié ainsi que les candidats vaccinaux. Les essais de vaccination pourraient, dès lors, être effectués à l'aide des modèles murins de dermatophytose à *A. benhamiae* et *A. vanbreuseghemii* mis au point lors de ce travail.

En conclusion, l'ensemble de ce travail a contribué à l'élargissement des connaissances sur la réponse immune au cours d'une dermatophytose à *M. canis* et a permis l'établissement d'un nouveau modèle murin de dermatophytose à *A. benhamiae* et

A. vanbreuseghemii. Ce modèle est approprié pour l'étude de la réponse immune anti-dermatophytes. Les résultats obtenus à l'issue de cette thèse devraient donc faciliter la mise au point de nouveaux outils thérapeutiques et/ou prophylactiques pour lutter contre les dermatophytoses.

CHAPITRE 6

Bibliographie

ABDALLAH D. S. A., EGAN C. E., BUTCHER B. A., DENKERS E. Y. Mouse neutrophils are professional antigen-presenting cells programmed to instruct Th1 and Th17 T-cell differentiation. *Int. Immunol.*, 2011, **23**, 317-326.

ACKERMAN A. B. Dermatophytosis. In: Ackerman AB, Chongchitnant N, Sanchez J, Guo J, Bennin B, Reichel M, Randall B (Eds.), *Histology diagnosis of inflammatory skin diseases*. Williams & Wilkins: Baltimore, 1997, 910.

ACORCI-VALÉRIO M. J., BORDON-GRACIANI A. P., DIAS-MELICIO L. A., DE ASSIS GOLIM M., NAKAIRA-TAKAHAGI E., DE CAMPOS SOARES Â. M. V. Role of TLR2 and TLR4 in human neutrophil functions against *Paracoccidioides brasiliensis*. *Scand. J. Immunol.*, 2010, **71**, 99-108.

AJELLO L., CHENG S. L. The perfect state of *Trichophyton mentagrophytes*. *Sabouraudia*, 1967, **5**, 230-234.

ALJABRE S. H., RICHARDSON M. D., SCOTT E. M., RASHID A., SHANKLAND G. S. Adherence of arthroconidia and germlings of anthropophilic and zoophilic varieties of *Trichophyton mentagrophytes* to human corneocytes as an early event in the pathogenesis of dermatophytosis. *Clin. Exp. Dermatol.*, 1993, **18**, 231-235.

ALLEN S.S., MCMURRAY D.N. Coordinate cytokine gene expression in vivo following induction of tuberculous pleurisy in guinea pigs. *Infect. Immun.*, 2003, **71**, 4271-4277.

ALMEIDA S. R. Immunology of Dermatophytosis. *Mycopathologia*, 2008, **166**, 277-283.

ALSHAHNI M.M., YAMADA T., TAKATORI K., SAWADA T., MAKIMURA K. Insights into a nonhomologous integration pathway in the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*: efficient targeted gene disruption by use of mutants lacking ligase IV. *Microbiol. Immunol.*, 2011, **55**, 34-43.

ARABATZIS M., BRUIJNESTEIJN VAN COPPENRAET L. E., KUIJPER E. J., DE HOOG G. S., LAVRIJSEN A. P., TEMPLETON K., VAN DER RAAIJ-HELMER E. M., VELEGRAKI A., GRASER Y., SUMMERBELL R. C. Diagnosis of common dermatophyte infections by a novel multiplex real-time polymerase chain reaction detection/identification scheme. *Br. J. Dermatol.*, 2007, **157**, 681-689.

ARABATZIS M., XYLOURI E., FRANGIADAKI I., TZIMOGIANNI A., MILIONI A., ARSENIS G., VELEGRAKI A. Rapid detection of *Arthroderma vanbreuseghemii* in rabbit skin specimens by PCR-RFLP. *Vet. Dermatol.*, 2006, **17**, 322-326.

BAGUT E. T., BALDO A., MATHY A., CAMBIER L., ANTOINE N., COZMA V., MIGNON B. Subtilisin Sub3 is involved in adherence of *Microsporium canis* to human and animal epidermis. *Vet. Microbiol.*, 2012, **160**, 413-419.

BALDO A., TABART J., VERMOUT S., MATHY A., COLLARD A., LOSSON B., MIGNON B. Secreted subtilisins of *Microsporium canis* are involved in adherence of arthroconidia to feline corneocytes. *J. Med. Microbiol.*, 2008, **57**, 1152-1156.

BALDO A., MATHY A., TABART J., CAMPONOVA P., VERMOUT S., MASSART L., MARECHAL F., GALLEN M., MIGNON B. Secreted subtilisin Sub3 from *Microsporium canis* is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. *Br. J. Dermatol.*, 2010, **162**, 990-997.

BALLOY V., SI-TAHAR M., TAKEUCHI O., PHILIPPE B., NAHORI M. A., TANGUY M., HUERRE M., AKIRA S., LATGE J. P., CHIGNARD M. Involvement of toll-like receptor 2 in experimental invasive pulmonary aspergillosis. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 5420-5425.

BEGUIN H., PYCK N., HENDRICKX M., PLANARD C., STUBBE D., DETANDT M. The taxonomic status of *Trichophyton quinckeanum* and *T. interdigitale* revisited: a multigene phylogenetic approach. *Med. Mycol.*, 2012, **50**, 871-882.

BELLOCCHIO S., MONTAGNOLI C., BOZZA S., GAZIANO R., ROSSI G., MAMBULA S. S., VECCHI A., MANTOVANI A., LEVITZ S. M., ROMANI L. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J. Immunol.*, 2004a, **172**, 3059-3069.

BELLOCCHIO S., MORETTI S., PERRUCCIO K., FALLARINO F., BOZZA S., MONTAGNOLI C., MOSCI P., LIPFORD G. B., PITZURRA L., ROMANI L. TLRs govern neutrophil activity in aspergillosis. *J. Immunol.*, 2004b, **173**, 7406-7415.

BENNOUNA S., BLISS S. K., CURIEL T. J., DENKERS E. Y. Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection. *J. Immunol.*, 2003, **171**, 6052-6058.

BERGMANS A. M., SCHOULS L. M., VAN DER ENT M., KLAASSEN A., BOHM N., WINTERMANS R. G. Validation of PCR-reverse line blot, a method for rapid detection and identification of nine dermatophyte species in nail, skin and hair samples. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2008, **14**, 778-788.

BETTELLI E., CARRIER Y. J., GAO W. D., KORN T., STROM T. B., OUKKA M., WEINER H. L., KUCHROO V. K. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector T(H)17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006, **441**, 235-238.

BETTELLI E., KORN T., KUCHROO V. K. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol.*, 2007, **19**, 652-657.

BLAKE J. S., DAHL M. V., HERRON M. J., NELSON R. D. An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. *J. Invest. Dermatol.*, 1991, **96**, 657-661.

BLANCO J. L., GARCIA M. E. Immune response to fungal infections. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2008, **125**, 47-70.

BODE C., ZHAO G., STEINHAGEN F., KINJO T., KLINMAN D.M. CpG DNA as a vaccine adjuvant. *Expert Rev. Vaccines*, 2011, **10**, 499-511.

BONFIM C. V., MAMONI R. L., BLOTTA M. H. S. L. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Med. Mycol.*, 2009, **47**, 722-733.

BONTEMS O., HAUSER P. M., MONOD M. Evaluation of a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism assay for dermatophyte and nondermatophyte identification in onychomycosis. *B.r J. Dermatol.*, 2009, **161**, 791-796.

BOZZA S., ZELANTE T., MORETTI S., BONIFAZI P., DELUCA A., D'ANGELO C., GIOVANNINI G., GARLANDA C., BOON L., BISTONI F., PUC CETTI P., MANTOVANI A., ROMANI L. Lack of Toll IL-1R8 exacerbates Th17 cell responses in fungal infection. *J. Immunol.*, 2008, **180**, 4022-4031.

BRADFORD M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, **72**, 248-254.

BRAKHAGE A. A., BRUNS S., THYWISSEN A., ZIPFEL P. F., BEHNSEN J. Interaction of phagocytes with filamentous fungi. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2010, **13**, 409-415.

BROMURO C., TOROSANTUCCI A., CHIANI P., CONTI S., POLONELLI L., CASSONE A. Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated Candidiasis in recipients of a *Candida albicans* vaccine. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 5462-5470.

BROUTA F., DESCAMPS F., FETT T., LOSSON B., GERDAY C., MIGNON B. Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporium canis*. *Med. Mycol.*, 2001, **39**, 269-275.

BROUTA F., DESCAMPS F., MONOD M., VERMOUT S., LOSSON B., MIGNON B. Secreted metalloprotease gene family of *Microsporium canis*. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 5676-5683.

BROUTA F., DESCAMPS F., VERMOUT S., MONOD M., LOSSON B., MIGNON B. Humoral and cellular immune response to a *Microsporium canis* recombinant keratinolytic metalloprotease (r-MEP3) in experimentally infected guinea pigs. *Med. Mycol.*, 2003, **41**, 495-501.

BROWN G. D. Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes. *Annu. Rev. Immunol.*, 2011, **29**, 1-21.

BRYANT P., PLOEGH H. Class II MHC peptide loading by the professionals. *Curr. Opin. Immunol.*, 2004, **16**, 96-102.

CALDERON R.A., HAY R.J. Cell-mediated immunity in experimental murine dermatophytosis. I. Temporal aspects of T-suppressor activity caused by *Trichophyton quinckeanum*. *Immunology*, 1984a, **53**, 457-464.

CALDERON R. A., HAY R. J. Cell-mediated immunity in experimental murine dermatophytosis. II. Adoptive transfer of immunity to dermatophyte infection by lymphoid cells from donors with acute or chronic infections. *Immunology*, 1984b, **53**, 465-472.

CALDERON R. A., HAY R. J. Fungicidal activity of human neutrophils and monocytes on dermatophyte fungi, *Trichophyton quinckeanum* and *Trichophyton rubrum*. *Immunology*, 1987, **61**, 289-295.

CALDERON R. A., SHENNAN G. I. Susceptibility of *Trichophyton quinckeanum* and *Trichophyton rubrum* to products of oxidative metabolism. *Immunology*, 1987, **61**, 283-288.

CALDERON R.A. Immunoregulation of dermatophytosis. *Crit. Rev. Microbiol.*, 1989, **16**, 339-368.

CAMBIER L., DEFAWEUX V., BALDO A., MATHY A., TABART J., BAGUT E. T., ANTOINE N., MIGNON B. Rôle des cellules Th17 dans les maladies infectieuses et auto-immunes. *Ann. Med. Vet.*, 2011, **154**, 104-112.

CAMBIER L., MATHY A., BALDO A., BAGUT E. T., TABART J., ANTOINE N., MIGNON B. Feline polymorphonuclear neutrophils produce pro-inflammatory cytokines following exposure to *Microsporium canis*. *Vet. Microbiol.*, 2013, **162**, 800-805.

CAMPOS M. R., RUSSO M., GOMES E., ALMEIDA S. R. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes Infect.*, 2006, **8**, 372-379.

CARBONNELLE E., NASSIF X. Utilisation en routine du MALDITOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. *Médecine Sciences*, 2011, **27**, 882-888.

CARLOTTI D.N., GUINOT P., MEISSONNIER E., GERMAIN P.A. Eradication of feline dermatophytosis in a shelter: a field study. *Vet. Dermatol.*, 2010, **21**, 259-266

CASADEVALL A. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect. Immun.*, 1995, **63**, 4211-4218.

CASADEVALL A., FELDMESSER M., PIROFSKI L.A. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2002, **5**, 386-391.

CASELLA C.R., MITCHELL T.C. Putting endotoxin to work for us: monophosphoryl lipid A as a safe and effective vaccine adjuvant. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008, **65**, 3231-3240.

CASSATELLA M. A. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol. Today*, 1995, **16**, 21-26.

CHAKIR H., WANG H. P., LEFEBVRE D. E., WEBB J., SCOTT F. W. T-bet/GATA-3 ratio as a measure of the Th1/Th2 cytokine profile in mixed cell populations: predominant role of GATA-3. *J. Immunol. Methods*, 2003, **278**, 157-169.

CHARMOY M., BRUNNER-AGTEN S., AEBISCHER D., AUDERSET F., LAUNOIS P., MILON G., PROUDFOOT A. E. I., TACCHINI-COTTIER F. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. *PLoS Pathog.*, 2010, **6**.

CHERMETTE R., FERREIRO L., GUILLOT J. Dermatophytoses in animals. *Mycopathologia*, 2008, **166**, 385-405.

CHOW J. C., YOUNG D. W., GOLENBOCK D. T., CHRIST W. J., GUSOVSKY F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J. Biol. Chem.*, 1999, **274**, 10689-10692.

CHUNG J. S., YUDATE T., TOMIHARI M., AKIYOSHI H., CRUZ P. D., JR., ARIIZUMI K. Binding of DC-HIL to dermatophytic fungi induces tyrosine phosphorylation and potentiates antigen presenting cell function. *J. Immunol.*, 2009, **183**, 5190-5198.

CONTI H.R., SHEN F., NAYYAR N., STOCUM E., SUN J.N., LINDEMANN M.J., HO A.W., HAI J.H., YU J.J., JUNG J.W., FILLER S.G., MASSO-WELCH P., EDGERTON M., GAFFEN S.L. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J. Exp. Med.*, 2009, **206**, 299-311.

CUNHA C., ROMANI L., CARVALHO A. Cracking the Toll-like receptor code in fungal infections. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.*, 2010, **8**, 1121-1137.

DABBAGH K., LEWIS D. B. Toll-like receptors and T-helper-1/T-helper-2 responses. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2003, **16**, 199-204.

DAHL M. V., CARPENTER R. Polymorphonuclear leukocytes, complement, and *Trichophyton rubrum*. *J. Invest. Dermatol.*, 1986, **86**, 138-141.

DAHL M. V. Dermatophytosis and the immune response. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1994, **31**, S34-41.

DE VROEY C. Formes sexuées des dermatophytes. Production de cléistothèces de *Microsporium gypseum* (Bodin) Guiart et Grigorakis sur divers milieux stériles. *Ann. Soc. Belge Méd. Trop.*, 1964, **44**, 831-840.

DEBOER D.J., MORIELLO K.A. Humoral and cellular immune responses to *Microsporium canis* in naturally occurring feline dermatophytosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1993, **31**, 121-132.

DEBOER D. J., MORIELLO K. A. The immune response to *Microsporium canis* induced by a fungal cell wall vaccine. *Vet. Dermatol.*, 1994, **5**, 47-55.

DEBOER D. J., MORIELLO K. A. Clinical update on feline dermatophytosis-Part I. *The Compendium*, 1995a, **17**, 1197-1203.

DEBOER D. J., MORIELLO K. A. Investigations of a killed dermatophyte cell-wall vaccine against infection with *Microsporium canis* in cats. *Res. Vet. Sci.*, 1995b, **59**, 110-113.

DEBOER D. J., MORIELLO K. A., BLUM J. L., VOLK L. M., BREDAHL L. K. Safety and immunologic effects after inoculation of inactivated and combined live-inactivated dermatophytosis vaccines in cats. *Am. J. Vet. Res.*, 2002, **63**, 1532-1537.

DEGREEF H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). *Mycopathologia*, 2008, **166**, 257-265.

DESCAMPS F., BROUTA F., MONOD M., ZAUGG C., BAAR D., LOSSON B., MIGNON B. Isolation of a *Microsporium canis* gene family encoding three subtilisin-like proteases expressed in vivo. *J. Invest. Dermatol.*, 2002, **119**, 830-835.

DESCAMPS F., BROUTA F., VERMOUT S., MONOD M., LOSSON B., MIGNON B. Recombinant expression and antigenic properties of a 31.5-kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporium canis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003a, **38**, 29-34.

DESCAMPS F. F., BROUTA F., VERMOUT S. M., WILLAME C., LOSSON B. J., MIGNON B. R. A recombinant 31.5 kDa keratinase and a crude exo-antigen from *Microsporium canis* fail to protect against a homologous experimental infection in guinea pigs. *Vet. Dermatol.*, 2003b, **14**, 305-312.

DEWALS B., HOVING J. C., HORSNELL W. G., BROMBACHER F. Control of *Schistosoma mansoni* egg-induced inflammation by IL-4-responsive CD4+CD25-CD103+Foxp3- cells is IL-10-dependent. *Eur. J. Immunol.*, 2010; **40**: 2837-2847.

DJEU J.Y., MATSUSHIMA K., OPPENHEIM J.J., SHIOTSUKI K., BLANCHARD D.K. Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/IL-8. *J. Immunol.*, 1990, **144**, 2205-2210.

DOCKRELL D. H., MCGRATH E. E., WHYTE M. K., SABROE I. The neutrophil. In: Brown GD, Netea MG (Eds.), *Immunology of fungal infections*. Springer: The Netherlands, 2007, 51-73.

DROUOT S., MIGNON B., FRATTI M., ROOSJE P., MONOD M. Pets as the main source of two zoonotic species of the *Trichophyton mentagrophytes* complex in Switzerland, *Arthroderma vanbreuseghemii* and *Arthroderma benhamiae*. *Vet. Dermatol.*, 2009, **20**, 13-18.

DUHEN T., GEIGER R., JARROSSAY D., LANZAVECCHIA A., SALLUSTO F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat. Immunol.*, 2009, **10**, 857-863.

ELAD D., SEGAL E. Immunogenicity in guinea-pigs of a crude ribosomal fraction from *Microsporum canis*. *Vaccine*, 1994, **12**, 134-138.

ELAD D., SEGAL E. Immunogenicity in calves of a crude ribosomal fraction of *Trichophyton verrucosum*: a field trial. *Vaccine*, 1995, **13**, 83-87.

ESCHE C., STELLATO C., BECK L. A. Chemokines: key players in innate and adaptive immunity. *J. Invest. Dermatol.* 2005; **125**: 615-28.

ESQUENAZI D., DE SOUZA W., ALVIANO C. S., ROZENTAL S. The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003, **35**, 113-123.

ESQUENAZI D., ALVIANO C. S., DE SOUZA W., ROZENTAL S. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Res. Microbiol.*, 2004, **155**, 144-153.

EYERICH S., EYERICH K., PENNINO D., CARBONE T., NASORRI F., PALLOTTA S., CIANFARANI F., ODORISIO T., TRIDL-HOFFMANN C., BEHRENDT H., DURHAM S. R., SCHMIDT-WEBER C. B., CAVANI A. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J. Clin. Invest.*, 2009, **119**, 3573-3585.

FARTASCH M. The epidermal lamellar body: a fascinating secretory organelle. *J. Invest. Dermatol.*, 2004, **122**, XI-XII.

FITZGERALD K. A., MCWHIRTER S. M., FAIA K. L., ROWE D. C., LATZ E., GOLENBOCK D. T., COYLE A. J., LIAO S. M., MANIATIS T. IKKepsilon and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nat. Immunol.*, 2003a, **4**, 491-496.

FITZGERALD K. A., ROWE D. C., BARNES B. J., CAFFREY D. R., VISINTIN A., LATZ E., MONKS B., PITHA P. M., GOLENBOCK D. T. LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.*, 2003b, **198**, 1043-1055.

FRADIN C., MAVOR A. L., WEINDL G., SCHALLER M., HANKE K., KAUFMANN S. H. E., MOLLENKOPF H., HUBE B. The early transcriptional response of human granulocytes to infection with *Candida albicans* is not essential for killing but reflects cellular communications. *Infect. Immun.*, 2007, **75**, 1493-1501.

FRANCHINI M., ZINI E., OSTO M., JABLONSKI K., KAUFMANN K., LUTZ T.A., REUSCH C.E., ACKERMANN M. Feline pancreatic islet-like clusters and insulin producing cells express functional Toll-like receptors (TLRs). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2010, **138**, 70-78.

FUMEAUX J., MOCK M., NINET B., JAN I., BONTEMS O., LECHENNE B., LEW D., PANIZZON R. G., JOUSSON O., MONOD M. First report of *Arthroderma benhamiae* in Switzerland. *Dermatology*, 2004, **208**, 244-250.

GAFFEN S. L., CONTI H. R., SHEN F., NAYYAR N., STOCUM E., SUN J. N., LINDEMANN M. J., HO A., HAI J. H., MASSO-WELCH P., EDGERTON M. Th17/IL-17 receptor signaling and not Th1 cells are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *Cytokine*, 2009, **48**, 43-43.

GARCÍA-MADRID L. A., HUIZAR-LÓPEZ M. D. R., FLORES-ROMO L., ISLAS-RODRÍGUEZ A. E. *Trichophyton rubrum* manipulates the innate immune functions of human keratinocytes. *Centr. Eur. J. Biol.*, 2011, **6**, 902-910.

GODINEZ I., HANEDA T., RAFFATELLU M., GEORGE M.D., PAIXAO T.A., ROLAN H.G., SANTOS R.L., DANDEKAR S., TSOLIS R.M., BAUMLER A.J. T cells help to amplify inflammatory responses induced by *Salmonella enterica* serotype Typhimurium in the intestinal mucosa. *Infect. Immun.*, 2008, **76**, 2008-2017.

GORDON S. Mononuclear phagocytes in immune defence. In: Roitt I, Brostoff B, Male D (Eds.), *Immunology*. Mosby: Edinburgh, 2001, 147-162.

GRAPPEL S. F., BLANK F., BISHOP C. T. Immunological studies on dermatophytes. IV. Chemical structures and serological reactivities of polysaccharides from *Microsporium praecox*, *Trichophyton ferrugineum*, *Trichophyton sabouraudii*, and *Trichophyton tonsurans*. *J. Bacteriol.*, 1969, **97**, 23-26.

GRAPPEL S. F., BLANK F. Role of keratinases in dermatophytosis. I. Immune responses of guinea pigs infected with *Trichophyton mentagrophytes* and guinea pigs immunized with keratinases. *Dermatologica*, 1972, **145**, 245-255.

GRASER Y., SCOTT J., SUMMERBELL R. The new species concept in dermatophytes-a polyphasic approach. *Mycopathologia*, 2008, **166**, 239-256.

GREEN F., BALISH E. Suppression of in vitro lymphocyte transformation during an experimental dermatophyte infection. *Infect. Immun.*, 1979, **26**, 554-562.

GRIFFIN G. K., NEWTON G., TARRIO M. L., BU D. X., MAGANTO-GARCIA E., AZCUTIA V., ALCAIDE P., GRABIE N., LUSCINSKAS F. W., CROCE K. J., LICHTMAN A. H. IL-17 and TNF-alpha sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation. *J. Immunol.*, 2012, **188**, 6287-6299.

GROSS O., GEWIES A., FINGER K., SCHAFFER M., SPARWASSER T., PESCHEL C., FORSTER I., RULAND J. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature*, 2006, **442**, 651-656.

GROSS O., POECK H., BSCHIEDER M., DOSTERT C., HANNESSCHLAGER N., ENDRES S., HARTMANN G., TARDIVEL A., SCHWEIGHOFFER E., TYBULEWICZ V., MOCSAI A., TSCHOPP J., RULAND J. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature*, 2009, **459**, 433-436.

GROUARD G., RISSOAN M. C., FILGUEIRA L., DURAND I., BANCHEREAU J., LIU Y. J. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J. Exp. Med.*, 1997, **185**, 1101-1111.

GRUMBT M., DEFAWEUX V., MIGNON B., MONOD M., BURMESTER A., WOSTEMEYER J., STAIB P. Targeted gene deletion and in vivo analysis of putative virulence gene function in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae*. *Eukaryot. Cell*, 2011, **10**, 842-853.

GRUMBT M., MONOD M., YAMADA T., HERTWECK C., KUNERT J., STAIB P. Keratin degradation by dermatophytes relies on cysteine dioxygenase and a sulfite efflux pump. *J. Invest. Dermatol.*, 2013, **133**, 1550-1555.

GUDDING R., NAEISS B. Vaccination of cattle against ringworm caused by *Trichophyton verrucosum*. *Am. J. Vet. Res.*, 1986, **47**, 2415-2417.

GUDDING R., LUND A. Immunoprophylaxis of bovine dermatophytosis. *Can. Vet. J.*, 1995, **36**, 302-306.

GUILLOT J., LATIE L., DEVILLE M., HALOS L., CHERMETTE R. Evaluation of the dermatophyte test medium RapidVet-D. *Vet. Dermatol.*, 2001, **12**, 123-127.

GUPTA A. K., COOPER E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 2008, **166**, 353-367.

HARDER J., SCHRODER J. M. Antimicrobial peptides in human skin. *Chem. Immunol. Allergy*, 2005, **86**, 22-41.

HARDISON S. E., BROWN G. D. C-type lectin receptors orchestrate antifungal immunity. *Nat. Immunol.*, 2012, **13**, 817-822.

HASHIMOTO C., HUDSON K. L., ANDERSON K. V. The Toll gene of *Drosophila*, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 1988, **52**, 269-279.

HATTERMANN K., PICARD S., BORGEAT M., LECLERC P., POULIOT M., BORGEAT P. The Toll-like receptor 7/8-ligand resiquimod (R-848) primes human neutrophils for leukotriene B₄, prostaglandin E₂ and platelet-activating factor biosynthesis. *FASEB J.*, 2007, **21**, 1575-1585.

HAWKSWORTH D. L., CROUS P. W., REDHEAD S. A., *et al.* The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus* 2011; **2**: 105-12.

HAY R. J., CALDERON R. A., COLLINS M. J. Experimental dermatophytosis: the clinical and histopathologic features of a mouse model using *Trichophyton quinckeanum* (mouse favus). *J. Invest. Dermatol.*, 1983, **81**, 270-274.

HAY R. J., CALDERON R. A., MACKENZIE C. D. Experimental dermatophytosis in mice: correlation between light and electron microscopic changes in primary, secondary and chronic infections. *Br. J. Exp. Pathol.*, 1988, **69**, 703-716.

HAY R. J., JONES R. M. New molecular tools in the diagnosis of superficial fungal infections. *Clin. Dermatol.*, 2010, **28**, 190-196.

HAYASHI F., SMITH K. D., OZINSKY A., HAWN T. R., YI E. C., GOODLETT D. R., ENG J. K., AKIRA S., UNDERHILL D. M., ADEREM A. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, 2001, **410**, 1099-1103.

HEDDERGOTT C., BRUNS S., NIETZSCHE S., LEONHARDT I., KURZAI O., KNIEMEYER O., BRAKHAGE A. A. The *Arthroderma benhamiae* hydrophobin HypA mediates hydrophobicity and influences recognition by human immune effector cells. *Eukaryot. Cell*, 2012, **11**, 673-682.

HSU S. C., WANG L. T., YAO C. L., LAI H. Y., CHAN K. Y., LIU B. S., CHONG P., LEE O. K., CHEN H. W. Mesenchymal stem cells promote neutrophil activation by inducing IL-17 production in CD4⁺ CD45RO⁺ T cells. *Immunobiology*, 2013, **218**, 90-95.

HUANG W., NA L., FIDEL P.L., SCHWARZENBERGER P. Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J. Infect. Dis.*, 2004, **190**, 624-631.

HUNG C. Y., SESHAN K. R., YU J. J., SCHALLER R., XUE J., BASRUR V., GARDNER M. J., COLE G. T. A metalloproteinase of *Coccidioides posadasii* contributes to evasion of host detection. *Infect. Immun.*, 2005, **73**, 6689-6703.

IGNACIO G., NORDONE S., HOWARD K.E., DEAN G.A. Toll-like receptor expression in feline lymphoid tissues. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 2005, **106**, 229-237.

IKUTA K., SHIBATA N., BLAKE J.S., DAHL M.V., NELSON R.D. HISAMICHI K., KOBAYASHI H., SUZUKI S., OKAWA Y. NMR study of the galactomannans of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Biochem. J.*, 1997, **323**, 297-305.

JANEWAY C. A., TRAVERS P., WELPORT M., SHLOMCHIK M. Immunobiology. Garland Science: New York, 2001, 910 p.

JANKE M., POTTH J., WIMMENAUER V., GIESE T., COCH C., BARCHET W., SCHLEE M., HARTMANN G. Selective and direct activation of human neutrophils but not eosinophils by Toll-like receptor 8. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009, **123**, 1026-1033.

JOFFRE O., NOLTE M. A., SPORRI R., SOUSA C. R. E. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol. Rev.*, 2009, **227**, 234-247.

JOHNSON A. G., TOMAI M., SOLEM L., BECK L., RIBI E. Characterization of a nontoxic monophosphoryl lipid A. *Rev. Infect. Dis.*, 1987, **9 Suppl 5**, S512-516.

JOLY S., MA N., SADLER J. J., SOLL D. R., CASSEL S. L., SUTTERWALA F. S. Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *J. Immunol.*, 2009, **183**, 3578-3581.

JOUSSON O., LECHENNE B., BONTEMS O., CAPOCCIA S., MIGNON B., BARBLAN J., QUADRONI M., MONOD M. Multiplication of an ancestral gene encoding secreted fungalysin preceded species differentiation in the dermatophytes *Trichophyton* and *Microsporum*. *Microbiology*, 2004, **150**, 301-310.

KAAMAN T., VON STEDINGK L. V., VON STEDINGK M., WASSERMAN J. ELISA-determined serological reactivity against purified trichophytin in dermatophytosis. *Acta Derm. Venereol.*, 1981, **61**, 313-317.

KAHLKE B., BRASCH J., CHRISTOPHERS E., SCHRODER J. M. Dermatophytes contain a novel lipid-like leukocyte activator. *J. Invest. Dermatol.*, 1996, **107**, 108-112.

KANBE T. Molecular Approaches in the Diagnosis of Dermatophytosis. *Mycopathologia*, 2008, **166**, 307-317.

KANO R., HIRAI A., MURAMATSU M., WATARI T., HASEGAWA A. Direct detection of dermatophytes in skin samples based on sequences of the chitin synthase 1 (CHS1) gene. *J. Vet. Med. Sci.*, 2003, **65**, 267-270.

KAUFMAN G., HORWITZ B. A., DUEK L., ULLMAN Y., BERDICEVSKY I. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. *Med. Mycol.*, 2007, **45**, 149-155.

KAWAI T., AKIRA S. TLR signaling. *Semin. Immunol.*, 2007, **19**, 24-32.

KORN T., BETTELLI E., OUKKA M., KUCHROO V. K. IL-17 and Th17 Cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, **27**, 485-517.

KOZIEL J., KARIM A. Y., PRZYBYSZEWSKA K., KSIAZEK M., RAPALAKOZIK M., NGUYEN K. A., POTEPA J. Proteolytic inactivation of LL-37 by karilysin, a novel virulence mechanism of *Tannerella forsythia*. *J. Innate Immun.*, 2010, **2**, 288-293.

KRAEMER A., MUELLER R. S., WERCKENTHIN C., STRAUBINGER R. K., HEIN J. Dermatophytes in pet Guinea pigs and rabbits. *Vet. Microbiol.*, 2012, **157**, 208-213.

KUJIK H. A., MARCIAT D., MUNOZ BIELSA J. Efficacy of a live vaccine (Bovilis Ringvac) against *Trichophyton verrucosum* in veal calves. 23rd World Buiatrics Congress, International Veterinary Information Service (IVIS), Quebec, Canada, 2004, 516.

KUMAGAI Y., TAKEUCHI O., AKIRA S. Pathogen recognition by innate receptors. *J. Infect. Chemother.*, 2008, **14**, 86-92.

KUMAR V., SHARMA A. Neutrophils: Cinderella of innate immune system. *Int. Immunopharmacol.*, 2010, **10**, 1325-1334.

KUNERT J. Keratin decomposition by dermatophytes: evidence of the sulphitolysis of the protein. *Experientia*, 1972, **28**, 1025-1026.

LATEUR N. *Tinea capitis* chez l'enfant : diagnostic, étiologie et traitement. *Percentile*, 2000, **5**, 100-103.

LATGE J. P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1999, **12**, 310-350.

LECHENNE B., REICHARD U., ZAUGG C., FRATTI M., KUNERT J., BOULAT O., MONOD M. Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes. *Microbiology*, 2007, **153**, 905-913.

LI M., CHEN Q., SHEN Y., LIU W. *Candida albicans* phospholipomannan triggers inflammatory responses of human keratinocytes through Toll-like receptor 2. *Exp. Dermatol.*, 2009, **18**, 603-610.

LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 2001, **25**, 402-408.

LOPEZ-RIBOT J., DIEZ-OREJAS R., CONCHA G. Antibodies. In: Brown GD, Netea MG (Eds.), *Immunology of fungal infections*. Springer: New York, 2007, 235-256.

LOSSE J., SVOBODOVÁ E., HEYKEN A., HUBE B., ZIPFEL P. F., JÓZSI M. Role of pH-regulated antigen 1 of *Candida albicans* in the fungal recognition and antifungal response of human neutrophils. *Mol. Immunol.*, 2011, **48**, 2135-2143.

LUND A., BRATBERG A. M., SOLBAKK I. T. In vitro release of interferon-gamma by trichophylin-stimulated whole blood cell cultures from ringworm-vaccinated and control calves experimentally inoculated with *Trichophyton verrucosum*. *Vet. Dermatol.*, 2001, **12**, 75-80.

LUND A., DEBOER D. J. Immunoprophylaxis of dermatophytosis in animals. *Mycopathologia*, 2008, **166**, 407-424.

MA Z., WANG Y., ZHU X., ZHANG C., LI S., JIN L., SHEN Y., HAAPASALO M. Role of polymorphonuclear neutrophils in the clearance of *Enterococcus faecalis* derived from saliva and infected root canals. *J. Endod.*, 2011, **37**, 346-352.

MACKICHAN M. L. Toll bridge to immunity. Immune molecules hold promise for vaccine adjuvant discovery. *IAVI Rep.*, 2005, **9**, 1-5.

MATHY A., BALDO A., SCHOofs L., CAMBIER L., DEFAWEUX V., TABART J., MARECHAL F., SYMOENS F., MIGNON B. Fungalyisin and dipeptidyl-peptidase gene transcription in *Microsporium canis* strains isolated from symptomatic and asymptomatic cats. *Vet. Microbiol.*, 2010, **146**, 179-182.

MATHY A. Contribution à l'étude du rôle des protéases de *Microsporium canis* dans les premières étapes du processus infectieux et caractérisation d'un nouveau facteur potentiel de virulence (PhD Thesis). Université de Liège: Liège, 2012, 183 p.

MEGIOVANNI A. M., SANCHEZ F., ROBLEDO-SARMIENTO M., MOREL C., GLUCKMAN J. C., BOUDALY S. Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: A new link between leukocytes upstream of T lymphocytes. *J. Leukoc. Biol.*, 2006, **79**, 977-988.

MIGNON B. R., LOSSON B. J. Prevalence and characterization of *Microsporium canis* carriage in cats. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1997, **35**, 249-256.

MIGNON B., SWINNEN M., BOUCHARA J. P., HOFINGER M., NIKKELS A., PIERARD G., GERDAY C., LOSSON B. Purification and characterization of a 315 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporium canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. *Med. Mycol.*, 1998a, **36**, 395-404.

MIGNON B. R., NIKKELS A. F., PIERARD G. E., LOSSON B. J. The in vitro and in vivo production of a 31.5-kD keratinolytic subtilase from *Microsporium canis* and the clinical status in naturally infected cats. *Dermatology*, 1998b, **196**, 438-441.

MIGNON B. R., COIGNOUL F., LECLIPTEUX T., FOCANT C., LOSSON B. J. Histopathological pattern and humoral immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporium canis* in symptomatic and asymptomatic infected cats. *Med. Mycol.*, 1999a, **37**, 1-9.

MIGNON B. R., LECLIPTEUX T., FOCANT C., NIKKELS A. J., PIERARD G. E., LOSSON B. J. Humoral and cellular immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporium canis* in experimentally infected guinea pigs. *Med. Mycol.*, 1999b, **37**, 123-129.

MIGNON B., TABART J., BALDO A., MATHY A., LOSSON B., VERMOUT S. Immunization and dermatophytes. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2008, **21**, 134-140.

MIGNON B. Dermatophytoses : actualités épidémiologiques et diagnostiques. *Pratique Vet.*, 2010, **45**, 626-632.

MIGNON B., MONOD M. Zoonotic infections with dermatophyte fungi. In: Palmer SR, Soulsby EJ, Torgerson PR, Brown DWG (Eds.), *Zoonoses*. Oxford University Press: Oxford, 2011, 838-849.

MILAN R., ALOIS R., JOSEF C., JANA B., EVZEN W. Recombinant protein and DNA vaccines derived from hsp60 *Trichophyton mentagrophytes* control the clinical course of trichophytosis in bovine species and guinea-pigs. *Mycoses*, 2004, **47**, 407-417.

MIYAZATO A., NAKAMURA K., YAMAMOTO N., MORA-MONTES H. M., TANAKA M., ABE Y., TANNO D., INDEN K., GANG X., ISHII K., TAKEDA K., AKIRA S., SAIJO S., IWAKURA Y., ADACHI Y., OHNO N., MITSUTAKE K., GOW N. A., KAKU M., KAWAKAMI K. Toll-like receptor 9-dependent activation of myeloid dendritic cells by Deoxynucleic acids from *Candida albicans*. *Infect. Immun.*, 2009, **77**, 3056-3064.

MONOD M., JACCOUD S., STIRNIMANN R., ANEX R., VILLA F., BALMER S., PANIZZON R. Economical microscope configuration for direct mycological examination with fluorescence in dermatology. *Dermatology*, 2000, **201**, 246-248.

MONOD M., BONTEMS O., ZAUGG C., LECHENNE B., FRATTI M., PANIZZON R. Fast and reliable PCR/sequencing/RFLP assay for identification of fungi in onychomycoses. *J. Med. Microbiol.*, 2006, **55**, 1211-1216.

MONOD M. Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia*, 2008, **166**, 285-294.

MORELLO C.S., KRAYNYAK K.A., LEVINSON M.S., CHEN Z., LEE K.F., SPECTOR D.H. Inactivated HSV-2 in MPL/alum adjuvant provides nearly complete protection against genital infection and shedding following long term challenge and rechallenge. *Vaccine*, 2012, **30**, 6541-6550.

MORIELLO K. A. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. *Vet. Dermatol.*, 2004, **15**, 99-107.

MOSCI P., PERICOLINI E., GABRIELLI E., KENNO S., PERITO S., BISTONI F., D'ENFERT C., VECCHIARELLI A. A novel bioluminescence mouse model for monitoring oropharyngeal candidiasis in mice. *Virulence*, 2013, **4**, 250-254.

MULLER G. H., KIRK R. W., SCOTT D. W. Fungal diseases. In: Dyson J (Eds.), *Small animal dermatology*. WB Saunders: Philadelphia, 1989, 295-346.

NAKAMURA Y., KANO R., HASEGAWA A., WATANABE S. Interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha production in human epidermal keratinocytes induced by *Trichophyton mentagrophytes*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2002, **9**, 935-937.

NAKAMURA K., MIYAZATO A., XIAO G., HATTA M., INDEN K., AOYAGI T., SHIRATORI K., TAKEDA K., AKIRA S., SAIJO S., IWAKURA Y., ADACHI Y., OHNO N., SUZUKI K., FUJITA J., KAKU M., KAWAKAMI K. Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J. Immunol.*, 2008, **180**, 4067-4074.

NAKAMURA T., NISHIBU A., YASOSHIMA M., TANOUE C., YOSHIDA N., HATTA J., MIYAMOTO T., NISHII M., YANAGIBASHI T., NAGAI Y., TAKATSU K., MOCHIZUKI T., OGAWA K. Analysis of *Trichophyton* antigen-induced contact hypersensitivity in mouse. *J. Dermatol. Sci.*, 2012, **66**, 144-153.

NAM Y. H., MIN A., KIM S. H., LEE Y. A., KIM K. A., SONG K. J., SHIN M. H. Leukotriene B₄ receptors BLT1 and BLT2 are involved in interleukin-8 production in human

neutrophils induced by *Trichomonas vaginalis*-derived secretory products. *Inflamm. Res.*, 2012, **61**, 97-102.

NETEA M. G., VAN DER MEER J. W. M., J. K. B. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. In: Brown GD, Netea MG (Eds.), *Immunology of fungal infections*. Springer: New York, 2007, 259-272.

NETEA M. G., BROWN G. D., KULLBERG B. J., GOW N. A. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2008, **6**, 67-78.

NINOMIYA J., IDE M., ITO Y., TAKIUCHI I. Experimental penetration of *Trichophyton mentagrophytes* into human *stratum corneum*. *Mycopathologia*, 1998, **141**, 153-157.

OH C., DONG Y., LIU H., THOMPSON L.P. Intrauterine hypoxia upregulates proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in fetal guinea pig hearts. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2008, **199**, 78 e71-76.

OLINS D. E., OLINS A. L. Chromatin history: our view from the bridge. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2003, **4**, 809-814.

PELLETIER M., MAGGI L., MICHELETTI A., LAZZERI E., TAMASSIA N., COSTANTINI C., COSMI L., LUNARDI C., ANNUNZIATO F., ROMAGNANI S., CASSATELLA M. A. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. *Blood*, 2010, **115**, 335-343.

PERERA P. Y., MAYADAS T. N., TAKEUCHI O., AKIRA S., ZAKSZILBERMAN M., GOYERT S. M., VOGEL S. N. CD11b/CD18 acts in concert with CD14 and Toll-like receptor (TLR) 4 to elicit full lipopolysaccharide and taxol-inducible gene expression. *J. Immunol.*, 2001, **166**, 574-581.

PIER A. C., HODGES A. B., LAUZE J. M., RAISBECK M. Experimental immunity to *Microsporum canis* and cross reactions with other dermatophytes of veterinary importance. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1995, **33**, 93-97.

PIER A. C., MORIELLO K. A. Parasitic relationship between *Microsporum canis* and the cat. *Med. Mycol.*, 1998, **36 Suppl 1**, 271-275.

PIVARCSI A., KEMENY L., DOBOZY A. Innate immune functions of the keratinocytes. A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 2004, **51**, 303-310.

PRINCE L. R., WHYTE M. K., SABROE I., PARKER L. C. The role of TLRs in neutrophil activation. *Curr. Opin. Pharmacol.*, 2011, **11**, 397-403.

PROST-SQUARCIANI C. Histology of skin and hair follicle. *Med Sci (Paris)*, 2006, **22**, 131-137.

QUINTILIO W., KUBRUSLY F.S., IOURTOV D., MIYAKI C., SAKAUCHI M.A., LUCIO F., DIAS SDE C., TAKATA C.S., MIYAJI E.N., HIGASHI H.G., LEITE L.C., RAW I. Bordetella pertussis monophosphoryl lipid A as adjuvant for inactivated split virion influenza vaccine in mice. *Vaccine*, 2009, **27**, 4219-4224.

RAMIREZ-ORTIZ Z. G., SPECHT C. A., WANG J. P., LEE C. K., BARTHOLOMEU D. C., GAZZINELLI R. T., LEVITZ S. M. Toll-like receptor 9-dependent immune activation by unmethylated CpG motifs in *Aspergillus fumigatus* DNA. *Infect. Immun.*, 2008, **76**, 2123-2129.

RENGARAJAN J., SZABO S.J., GLIMCHER L.H. Transcriptional regulation of Th1/Th2 polarization. *Immunol. Today*, 2000, **21**, 479-483.

RICHARDSON M. D. Diagnosis and pathogenesis of dermatophyte infections. *Br. J. Clin. Pract. Suppl.*, 1990, **71**, 98-102.

ROACH J. C., GLUSMAN G., ROWEN L., KAUR A., PURCELL M. K., SMITH K. D., HOOD L. E., ADEREM A. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, **102**, 9577-9582.

ROBERT R., PIHET M. Conventional methods for the diagnosis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 2008, **166**, 295-306.

ROBINSON M. J., OSORIO F., ROSAS M., FREITAS R. P., SCHWEIGHOFFER E., GROSS O., SJEFVERBEEK J., RULAND J., TYBULEWICZ V., BROWN G. D., MOITA L. F., TAYLOR P. R., SOUSA C. R. E. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J. Exp. Med.*, 2009, **206**, 2037-2051.

ROMANI L., ZELANTE T., LUCA A. D., FALLARINO F., PUCETTI P. IL-17 and therapeutic kynurenines in pathogenic inflammation to fungi. *J. Immunol.*, 2008, **180**, 5157-5162.

ROMANI L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.*, 2011, **11**, 275-288.

ROMERO C. D., VARMA T. K., HOBBS J. B., REYES A., DRIVER B., SHERWOOD E. R. The Toll-like receptor 4 agonist monophosphoryl lipid A augments innate host resistance to systemic bacterial infection. *Infect. Immun.*, 2011, **79**, 3576-3587.

ROTHMAN S., SMILJANIC A. M., WEITKAMP A. W. Mechanism of spontaneous cure in puberty of ringworm of the scalp. *Science*, 1946, **104**, 201-203.

ROUSSEL L., HOULE F., CHAN C., YAO Y., BERUBE J., OLIVENSTEIN R., MARTIN J. G., HUOT J., HAMID Q., FERRI L., ROUSSEAU S. IL-17 promotes p38 MAPK-dependent endothelial activation enhancing neutrophil recruitment to sites of inflammation. *J. Immunol.*, 2010, **184**, 4531-4537.

RUBIN-BEJERANO I., ABEIJON C., MAGNELLI P., GRISAFI P., FINK G. R. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe*, 2007, **2**, 55-67.

RYBNIKÁŘ A., CHUMELA J., VRZAL V., NEPEŘENÝ J. Vaccination of rabbits against trichophytosis - An experimental study. *Acta Veterinaria Brno*, 1998, **67**, 121-125.

SABAT R., GRUTZ G., WARSZAWSKA K., KIRSCH S., WITTE E., WOLK K., GEGINAT J. Biology of interleukin-10. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2010, **21**, 331-344.

SAEGUSA S., TOTSUKA M., KAMINOGAWA S., HOSOI T. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* stimulate cytokine secretion from human neutrophil-like HL-60 cells differentiated with retinoic acid or dimethylsulfoxide. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2009, **73**, 2600-2608.

SAID-SADIER N., PADILLA E., LANGSLEY G., OJCIUS D. M. *Aspergillus fumigatus* stimulates the NLRP3 inflammasome through a pathway requiring ROS production and the Syk tyrosine kinase. *PLoS one*, 2010, **5**, e10008.

SAIJO S., IKEDA S., YAMABE K., KAKUTA S., ISHIGAME H., AKITSU A., FUJIKADO N., KUSAKA T., KUBO S., CHUNG S. H., KOMATSU R., MIURA N., ADACHI Y., OHNO N., SHIBUYA K., YAMAMOTO N., KAWAKAMI K., YAMASAKI S., SAITO T., AKIRA S., IWAKURA Y. Dectin-2 Recognition of alpha-Mannans and Induction of Th17 Cell Differentiation Is Essential for Host Defense against *Candida albicans*. *Immunity*, 2010, **32**, 681-691.

SAIJO S., IWAKURA Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int. Immunol.*, 2011, **23**, 467-472.

SATO K., YANG X.L., YUDATE T., CHUNG J.S., WU J.M., LUBY-PHELPS K., KIMBERLY R.P., UNDERHILL D., CRUZ P.D., ARIIZUMI K. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J. Biol. Chem.*, 2006, **281**, 38854-38866.

SAUNTE D. M., HASSELBY J. P., BRILLOWSKA-DABROWSKA A., FRIMODT-MØLLER N., SVEJGAARD E. L., LINNEMANN D., NIELSEN S. S., HAEDERSDAL M., ARENDRUP M. C. Experimental guinea pig model of dermatophytosis: A simple and useful tool for the evaluation of new diagnostics and antifungals. *Med. Mycol.*, 2008, **46**, 303-313.

SAWANT K. V., MCMURRAY D. N. Guinea pig neutrophils infected with *Mycobacterium tuberculosis* produce cytokines which activate alveolar macrophages in noncontact cultures. *Infect. Immun.*, 2007, **75**, 1870-1877.

SCHALLER M., BOELD U., OBERBAUER S., HAMM G., HUBE B., KORTING H. C. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis. *Microbiology*, 2004, **150**, 2807-2813.

SCOTT D. W., MILLER W. H., GRIFFIN C. E. Fungal skin disease. In: Muller GH, Kirk RW (Eds.), *Small Animal Dermatology*. WB Saunders: Philadelphia, 2001, 339-361.

SEEBACHER C., BOUCHARA J. P., MIGNON B. Updates on the epidemiology of dermatophyte infections. *Mycopathologia*, 2008, **166**, 335-352.

SHERWIN W. K., ROSS T. H., ROSENTHAL C. M., PETROZZI J. W. An immunosuppressive serum factor in widespread cutaneous dermatophytosis. *Arch. Dermatol.*, 1979, **115**, 600-604.

SHIKANO S., BONKOBARA M., ZUKAS P. K., ARIIZUMI K. Molecular cloning of a dendritic cell-associated transmembrane protein, DC-HIL, that promotes RGD-dependent adhesion of endothelial cells through recognition of heparan sulfate proteoglycans. *J. Biol. Chem.*, 2001, **276**, 8125-8134.

SHIMAMURA T., KUBOTA N., SHIBUYA K. Animal model of dermatophytosis. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2012, **2012**, article ID 125384, 11 pages.

SHIRAKI Y., ISHIBASHI Y., HIRUMA M., NISHIKAWA A., IKEDA S. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *J. Med. Mycol.*, 2006, **55**, 1175-1185.

SHIRE D. An invitation to an open exchange of reagents and information useful for the measurements of cytokine mRNA levels by PCR. *Eur. Cytokine Netw.* 1993, **4**: 161-162.

SIEGAL F. P., KADOWAKI N., SHODELL M., FITZGERALD-BOCARSLY P. A., SHAH K., HO S., ANTONENKO S., LIU Y. J. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science*, 1999, **284**, 1835-1837.

SKRZYPEK F., CENCI E., PIETRELLA D., RACHINI A., BISTONI F., VECCHIARELLI A. Dectin-1 is required for human dendritic cells to initiate immune response to *Candida albicans* through Syk activation. *Microbes Infect.*, 2009, **11**, 661-670.

SLESIONA S., IBRAHIM-GRANET O., OLIAS P., BROCK M., JACOBSEN I. D. Murine infection models for *Aspergillus terreus* pulmonary aspergillosis reveal long-term persistence of conidia and liver degeneration. *J. Infect. Dis.*, 2012, **205**, 1268-1277.

- SPARKES A.H., STOKES C.R., GRUFFYDD-JONES T.J. Humoral immune responses in cats with dermatophytosis. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 1869-1873.
- SPARKES A. H., WERRETT G., STOKES C. R., GRUFFYDD-JONES T. J. *Microsporum canis*: Inapparent carriage by cats and the viability of arthrospores. *Journal of Small Animal Practice*, 1994, **35**, 397-401.
- SRIRANGANADANE D., WARIDEL P., SALAMIN K., FEUERMANN M., MIGNON B., STAIB P., NEUHAUS J. M., QUADRONI M., MONOD M. Identification of novel secreted proteases during extracellular proteolysis by dermatophytes at acidic pH. *Proteomics*, 2011, **11**, 4422-4433.
- STAIB P., ZAUGG C., MIGNON B., WEBER J., GRUMBT M., PRADERVAND S., HARSHMAN K., MONOD M. Differential gene expression in the pathogenic dermatophyte *Arthroderma benhamiae* in vitro versus during infection. *Microbiology*, 2010, **156**, 884-895.
- STOCKINGER B., VELDHOEN M. Differentiation and function of Th17 T cells. *Curr. Opin. Immunol.*, 2007, **19**, 281-286.
- SWAN J. W., DAHL M. V., COPPO P. A., HAMMERSCHMIDT D. E. Complement activation by *Trichophyton rubrum*. *J. Invest. Dermatol.*, 1983, **80**, 156-158.
- SYMOENS F., JOUSSON O., PLANARD C., FRATTI M., STAIB P., MIGNON B., MONOD M. Molecular analysis and mating behaviour of the *Trichophyton mentagrophytes* species complex. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2011, **301**, 260-266.
- SYMOENS F., JOUSSON O., PACKEU A., FRATTI M., STAIB P., MIGNON B., MONOD M. The dermatophyte species *Arthroderma benhamiae*: Intraspecies variability and mating behaviour. *J. Med. Microbiol.*, 2013, **62**, 377-385.
- TABART J., BALDO A., VERMOUT S., NUSGENS B., LAPIERE C., LOSSON B., MIGNON B. Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for *Microsporum canis* dermatophytosis. *J. Med. Microbiol.*, 2007, **56**, 971-975.
- TABART J., BALDO A., VERMOUT S., LOSSON B., MIGNON B. Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for the screening of antifungal drugs against *Microsporum canis*. *Vet. Dermatol.*, 2008, **19**, 130-133.
- TABART J. Contribution à l'étude du rôle des cellules épidermiques dans la mise en place de la réponse immune anti-*Microsporum canis* (PhD Thesis). Faculté de Médecine vétérinaire : Liège, 2008, 172 p.
- TADA H., NEMOTO E., SHIMAUCHI H., WATANABE T., MIKAMI T., MATSUMOTO T., OHNO N., TAMURA H., SHIBATA K., AKASHI S., MIYAKE K., SUGAWARA S., TAKADA H. *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived

mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol. Immunol.*, 2002, **46**, 503-512.

TAKASHIO M. Une nouvelle forme sexuée du complexe *Trichophyton mentagrophytes*, *Arthroderma vanbreuseghemii*. sp.nov. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 1973, **48**, 713-732.

TAKEUCHI O., AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 2010, **140**, 805-820.

TAMASSIA N., LE MOIGNE V., ROSSATO M., DONINI M., MCCARTNEY S., CALZETTI F., COLONNA M., BAZZONI F., CASSATELLA M. A. Activation of an immunoregulatory and antiviral gene expression program in poly(I:C)-transfected human neutrophils. *J. Immunol.*, 2008, **181**, 6563-6573.

TANI K., ADACHI M., NAKAMURA Y., KANO R., MAKIMURA K., HASEGAWA A., KANDA N., WATANABE S. The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratinocytes. *Arch. Dermatol. Res.*, 2007, **299**, 381-387.

THOMPSON B. S., CHILTON P. M., WARD J. R., EVANS J. T., MITCHELL T. C. The low-toxicity versions of LPS, MPL adjuvant and RC529, are efficient adjuvants for CD4+ T cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2005, **78**, 1273-1280.

TRIFARI S., KAPLAN C. D., TRAN E. H., CRELLIN N. K., SPITS H. Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells. *Nat. Immunol.*, 2009, **10**, 864-871.

UENO H., KLECHEVSKY E., MORITA R., ASPORD C., CAO T., MATSUI T., DI PUCCHIO T., CONNOLLY J., FAY J. W., PASCUAL V., PALUCKA A. K., BANCHEREAU J. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol. Rev.*, 2007, **219**, 118-142.

URBAN C. F., ERMERT D., SCHMID M., ABU-ABED U., GOOSMANN C., NACKEN W., BRINKMANN V., JUNGBLUT P. R., ZYCHLINSKY A. Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog.*, 2009, **5**, e1000639.

VALLADEAU J., SAELAND S. Cutaneous dendritic cells. *Semin. Immunol.*, 2005, **17**, 273-283.

VAN CUTSEM J., ROCHETTE F. Mycoses des animaux domestiques. Janssen Research Foundation: Beerse, 1992, 226 p.

VAN DE VEERDONK F. L., KULLBERG B. J., VAN DER MEER J. W., GOW N. A., NETEA M. G. Host-microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2008, **11**, 305-312.

VAN GISBERGEN K. P., LUDWIG I. S., GEIJTENBEEK T. B., VAN KOOYK Y. Interactions of DC-SIGN with Mac-1 and CEACAM1 regulate contact between dendritic cells and neutrophils. *FEBS Lett.*, 2005, **579**, 6159-6168.

VENTURINI J., ÁLVARES A. M., DE CAMARGO M. R. D., MARCHETTI C. M., FRAGA-SILVA T. F. D. C., LUCHINI A. C., DE ARRUDA M. S. P. Dermatophyte-host relationship of a murine model of experimental invasive dermatophytosis. *Microbes Infect.*, 2012, **14**, 1144-1151.

VERMOUT S., DENIS M., LOSSON B., MIGNON B. Choice of an adjuvant for vaccination trials. *Ann. Med. Vet.*, 2003, **147**, 393-401.

VERMOUT S. M., BROUTA F. D., DESCAMPS F. F., LOSSON B. J., MIGNON B. R. Evaluation of immunogenicity and protective efficacy of a *Microsporium canis* metalloprotease subunit vaccine in guinea pigs. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2004, **40**, 75-80.

VERMOUT S., BALDO A., TABART J., LOSSON B., MIGNON B. Secreted dipeptidyl peptidases as potential virulence factors for *Microsporium canis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2008a, **54**, 299-308.

VERMOUT S., TABART J., BALDO A., MATHY A., LOSSON B., MIGNON B. Pathogenesis of dermatophytosis. *Mycopathologia*, 2008b, **166**, 267-275.

VOLPE E., SERVANT N., ZOLLINGER R., BOGIATZI S. I., HUPE P., BARILLOT E., SOUMELIS V. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat. Immunol.*, 2008, **9**, 650-657.

WANG J. E., WARRIS A., ELLINGSEN E. A., JORGENSEN P. F., FLO T. H., ESPEVIK T., SOLBERG R., VERWEIJ P. E., AASEN A. O. Involvement of CD14 and toll-like receptors in activation of human monocytes by *Aspergillus fumigatus* hyphae. *Infect. Immun.*, 2001, **69**, 2402-2406.

WEINDL G., NAGLIK J. R., KAESLER S., BIEDERMANN T., HUBE B., KORTING H. C., SCHALLER M. Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling. *J. Clin. Invest.*, 2007, **117**, 3664-3672.

WEITZMAN I., SUMMERBELL R. C. The dermatophytes. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1995, **8**, 240-259.

WESTHOFF D. K., KLOES M.-C., ORVEILLON F. X., FARNOW D., ELBERS K., MUELLER R. S. Treatment of feline dermatophytosis with an inactivated fungal vaccine. *The Open Mycology Journal*, 2010, **4**, 10-17.

WHITE T. C., OLIVER B. G., GRÄSER Y., HENN M. R. Generating and testing molecular hypotheses in the dermatophytes. *Eukaryot. Cell*, 2008, **7**, 1238-1245.

WILSON N. J., BONIFACE K., CHAN J. R., MCKENZIE B. S., BLUMENSCHNEIN W. M., MATTSON J. D., BASHAM B., SMITH K., CHEN T., MOREL F., LECRON J. C., KASTELEIN R. A., CUA D. J., MCCLANAHAN T. K., BOWMAN E. P., DE WAAL MALEFYT R. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat. Immunol.*, 2007, **8**, 950-957.

WOLK K., KUNZ S., WITTE E., FRIEDRICH M., ASADULLAH K., SABAT R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity*, 2004, **21**, 241-254.

WOODFOLK J. A., SLUNT J. B., DEUELL B., HAYDEN M. L., PLATTS-MILLS T. A. Definition of a *Trichophyton* protein associated with delayed hypersensitivity in humans. Evidence for immediate (IgE and IgG4) and delayed hypersensitivity to a single protein. *J. Immunol.*, 1996, **156**, 1695-1701.

WOODFOLK J. A., PLATTS-MILLS T. A. Diversity of the human allergen-specific T cell repertoire associated with distinct skin test reactions: delayed-type hypersensitivity-associated major epitopes induce Th1- and Th2-dominated responses. *J. Immunol.*, 2001, **167**, 5412-5419.

YAMAMOTO M., SATO S., HEMMI H., HOSHINO K., KAISHO T., SANJO H., TAKEUCHI O., SUGIYAMA M., OKABE M., TAKEDA K., AKIRA S. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science*, 2003, **301**, 640-643.

YIN J., FERGUSON T. A. Identification of an IFN- γ -producing neutrophil early in the response to *Listeria monocytogenes*. *J. Immunol.*, 2009, **182**, 7069-7073.

ZELANTE T., LUCA A. D., D'ANGELO C., MORETTI S., ROMANI L. IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: what's new? *Eur. J. Immunol.*, 2009, **39**, 645-648.

ZHOU L., LOPES J. E., CHONG M. M., IVANOV, II, MIN R., VICTORA G. D., SHEN Y., DU J., RUBTSOV Y. P., RUDENSKY A. Y., ZIEGLER S. F., LITTMAN D. R. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing ROR γ function. *Nature*, 2008, **453**, 236-240.

ZURITA J., HAY R. J. Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes in vitro. *J. Invest. Dermatol.*, 1987, **89**, 529-534.