



**HAL**  
open science

# Les glycannes pariétaux de levures et leur implication dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte

Aurore Sarazin

► **To cite this version:**

Aurore Sarazin. Les glycannes pariétaux de levures et leur implication dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte. Immunologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2010. Français. NNT: . tel-00493708

**HAL Id: tel-00493708**

**<https://theses.hal.science/tel-00493708>**

Submitted on 21 Jun 2010

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

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

**UNIVERSITE LILLE 2 - DROIT ET SANTE**

**Ecole Doctorale Biologie - Santé de Lille**

**THESE**

**Pour l'obtention du grade de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE LILLE 2**

**Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie**

**Spécialité : Biologie cellulaire**

**Présentée publiquement par**

**Aurore SARAZIN**

**Le 31 Mai 2010**

**Les glycannes pariétaux de levures et leur implication dans  
l'induction et la régulation de la réponse immunitaire de  
l'hôte**

**Membres du Jury :**

**Rapporteurs :       Dr Frédéric Dalle  
                              Pr Maria Martinez-Esparza**

**Examineurs :       Pr Daniel Poulain  
                              Pr Raymond Robert  
                              Dr Christian Slomianny**

**Directeur de thèse : Dr Thierry Jouault**

## Remerciements

Je remercie Monsieur Daniel Poulain de m'avoir accueillie dans son laboratoire, de m'avoir fait partager son expérience et ses nombreuses connaissances sur *Candida*. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

J'adresse mes vifs remerciements à Thierry Jouault, pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse sous sa direction et offert la possibilité de travailler sur un sujet passionnant. Merci pour ces années de conseils, d'encouragements, pour son soutien.

Je remercie vivement Madame Maria Martinez-Esparza et Monsieur Frédéric Dalle qui ont accepté de juger ce travail en tant que rapporteurs.

Merci à Monsieur Raymond Robert et Monsieur Christian Slomianny pour avoir participé au jury de cette thèse.

Merci à la Fondation Marcel Bleustein – Blanchet pour la Vocation de son soutien.

Merci à toutes les personnes du laboratoire pour leur accueil, pour m'avoir fait partager leurs longues années d'expériences techniques et pour leur grande sollicitude.

Merci à toutes les personnes (ami(e)s, famille, etc...) pour leurs encouragements, et leurs compréhensions.

# SOMMAIRE

<b>INTRODUCTION</b>	<b>8</b>
<b>GENERALITES</b>	<b>10</b>
<b>I. <u>Les Candidoses</u></b>	<b>11</b>
<b>A. Généralités</b>	<b>11</b>
<b>B. Les étapes de la transition colonisation/infection</b>	<b>13</b>
1- La multiplication tissulaire	13
2- L'invasion tissulaire	14
3- La dissémination hématogène	14
4- La multiplication tissulaire	14
<b>II. <u>C. albicans généralités</u></b>	<b>15</b>
<b>A. Caractères généraux des levures</b>	<b>15</b>
<b>B. Organisation cellulaire</b>	<b>16</b>
1- Les organites cytoplasmiques	16
2- Membrane plasmique	16
3- La paroi	17
4- La chitine et les $\beta$ -glucanes	19
5- Les mannoprotéines	19
6- Le phosphopeptidomannane	20
7- Les lipides et glycolipides	21
<b>III. <u>C. albicans : agent pathogène</u></b>	<b>23</b>
<b>A. Rôle de la paroi de C. albicans</b>	<b>23</b>
<b>B. Facteurs de virulence</b>	<b>24</b>
1- Dimorphisme	24
2- Adhérence	24
3- Protéines de sécrétion : enzymes hydrolytiques et autres protéines	25
4- « switching » ou phénotype alternatif	27
5- Formation de biofilm	28
6- Quorum Sensing	29
<b>IV. <u>Réponse immunitaire contre C. albicans</u></b>	<b>30</b>
<b>A. Immunité innée</b>	<b>30</b>
1- Barrières externes	30
2- Activation du complément (C3, MBL)	31

a. Phagocytose	34
b. Inflammation induite par le complément, eicosanoides et cytokines	
c. Activation des NK	42
<b>B. Immunité spécifique</b>	43
1- Immunité à médiation cellulaire	43
2- Lymphocytes B : anticorps	46
<b>V. <u>Cellules macrophagiques et pathogènes</u></b>	48
<b>A. Rôle dans l'immunité naturelle</b>	48
<b>B. Rôle dans l'immunité spécifique</b>	49
<b>C. Signalisation</b>	50
1- Protéines Tyrosine Kinases (PTKs)	51
2- Les Mapks	52
3- Récepteurs membranaires et signalisation	53
a. TLRs	55
b. Dectine-1	56
c. Mécanismes d'échappement des pathogènes aux fonctions macrophagiques	
<b>VI. <u>Interaction <i>C. albicans</i> / Macrophages</u></b>	58
<b>A. Molécules fongiques impliquées dans l'interaction <i>C. albicans</i> / macrophages</b>	
1- Le mannane	58
2- Le PLM	58
3- Les glycoprotéines	59
4- Les $\beta$ -glucanes	59
5- La chitine	59
6- Les $\beta$ 1,2-oligomannosides	60
<b>B. Récepteurs macrophagiques impliqués dans l'interaction <i>C. albicans</i> / macrophages</b>	61
1- Récepteurs macrophagiques opsoniques	61
a. Récepteur pour le fragment du complément	62
b. FcRs	62
c. MBL	62
2- Récepteurs macrophagiques non opsoniques	63
A. Récepteurs lectiniques	63
B. Récepteurs microbiologiques ou PRR (Pattern Recognition Receptors)	
<b>C. Stimulation des macrophages par <i>C. albicans</i> et ses composants</b>	71

<b>RESULTATS</b>	<b>83</b>
<b>I. Mise au point d'une méthode d'évaluation qualitative et quantitative de l'expression des glycannes pariétaux de levures</b>	<b>83</b>
<b>A. Mise au point de la méthode de cytométrie (article 2 et 3)</b>	<b>83</b>
<b>B. Application à l'étude de la spécificité d'un anticorps monoclonal</b>	<b>109</b>
1- Western blot sur extraits totaux de levures	
2- Cytométrie en flux	
3- Analyse par la méthode de Luminex	
4- Western blot sur des mutants	
<b>II. Evaluation de l'incidence de l'expression des glycannes pariétaux sur la réponse cellulaire de l'hôte (article 4)</b>	<b>116</b>
<b>III. Rôle des glycannes de la paroi de <i>C. albicans</i> dans l'orientation de la réponse immune</b>	<b>130</b>
<b>IV. Rôle de la phagocytose dans l'induction de l'expression des glycannes pariétaux de levures</b>	<b>133</b>
<b>DISCUSSION</b>	<b>136</b>
<b>MATERIELS ET METHODE</b>	<b>144</b>
<b>I. Souches de levures et cellules macrophagiques</b>	<b>145</b>
1- Levures	145
a. Souches de levures	
b. Obtention des modèles cellulaires	
c. Milieux et condition de culture	
2- Les lignées cellulaires	146
a. Lignée macrophagique J774	
b. Milieux et condition de culture	
<b>II. Analyse de l'expression glycannique de surface</b>	<b>147</b>
1- Anticorps utilisés	147
2- Cytométrie de flux	147
3- Immunofluorescence indirecte	148

<b>III. Evaluations des performances de l'anticorps 26G7</b>	<b>149</b>
1- Technique immunoélectrophorétique	149
a. Extraction alcaline en condition réductrice (AERC)	
b. Dosage des protéines	
c. Traitement des échantillons	
d. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)	
e. Electrophorétique en milieu semi sec	
f. Immunodétection sur membrane de nitrocellulose (Western blot)	
2- Luminex	150
<b>IV. Analyse de l'interaction <i>C. albicans</i>-macrophages</b>	<b>152</b>
1- Etude de la viabilité des levures après phagocytose par les macrophages	
2- Dosage immunoenzymatique du TNF $\alpha$ et de l'IL-10	152
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>153</b>

## **ABREVIATIONS**

CD	Cellules Dendritiques
TIR	Domaine Toll/Interleukin-1 receptor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ERK	Extracellular related kinase
GPI	Glycosylphosphatidyl inositol
IL-10	Interleukin-10
LPS	Lipopolysaccharide
MR	Mannose Receptor
NK	Cell Natural Killer
MAPK	Mitogen activated protein kinase
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PBS	Phosphate Buffer Saline
PKC	Protein kinase C
PLM	Phospholipomannane
PRR	Pattern recognition receptor
TLRs	Toll Like Receptors

# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION

Depuis la fin des années 80, l'incidence croissante des mycoses opportunistes est une des caractéristiques de l'évolution des pathologies infectieuses dans les pays à haut niveau de vie.

Le principal agent responsable est la levure *Candida albicans* à l'origine d'une grande variété de pathologies. La pathogénie des candidoses est fondée sur une série dynamique d'évènements qui opposent l'expression de composants de la levure à la réponse immune naturelle et adaptative de l'hôte. Il n'existe pas de réels facteurs de virulence chez *Candida*, mais un ensemble de propriétés adaptatives, qui sur un terrain favorable déplacent l'équilibre saprophyte/pathogène. *C. albicans* exprime des "sensors" lui permettant d'évaluer son environnement (pH, température, matrice cellulaire et protéique) responsables de cette adaptation rapide.

Plusieurs études ont montré que la présence des phagocytes était nécessaire pour juguler le développement et surtout la dissémination de *C. albicans*. Le macrophage, notamment, intervient à plusieurs niveaux : la phagocytose, la microbicidie, la régulation de la réponse immunitaire et la présentation d'antigènes. Il joue en effet un rôle central dans l'orientation et l'évolution de la réponse immune. En fonction des cytokines et autres médiateurs immunologiques qu'il produit, une réponse cellulaire (Th1) ou humorale (Th2) est privilégiée.

Parallèlement, il a été montré cliniquement et expérimentalement, que *C. albicans* pouvait influencer la réponse de son hôte en la dérégulant à son profit. En ce qui concerne la réponse macrophagique, *Candida* est capable de la neutraliser et d'échapper ainsi à son pouvoir phagocytaire. Bien que peu de données expérimentales existent sur les signaux de transduction induits par *C. albicans*, des études ont permis de mettre en évidence une induction par les levures de phosphorylation de différentes protéines macrophagiques sur des résidus tyrosine.

Les objectifs de notre travail étaient d'étudier le(s) rôle(s) des différents glycanes pariétaux de *C. albicans* et de *Saccharomyces cerevisiae* dans l'induction et dans la régulation de la réponse immune.

# **GENERALITES**

# GENERALITES

## I. Les Candidoses

### A. Généralités

Les candidoses sont des infections opportunistes cosmopolites dues à des levures du genre *Candida*. Il en existe environ 166 espèces.

Cependant, seule une dizaine d'entre-elles est capable d'envahir les tissus superficiels et profonds de l'hôte.

La transition saprophyte-pathogène s'opère lorsque le « terrain » devient favorable.

A titre d'exemple, elle peut se produire suite à une baisse des défenses immunitaires de l'hôte, locales ou générales, ou à la présence de certains facteurs favorisants, tels que la transpiration, la grossesse, une antibiothérapie, etc. permettant ainsi la multiplication des levures.

L'espèce la plus pathogène est *Candida albicans*, suivie de, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. rugosa*, etc (Odds, 2000, Gutierrez, *et al.*, 2002, Segal, 2005, Tortorano, *et al.*, 2006, Pfaller & Diekema, 2007, Del Palacio, *et al.*, 2009, Garcia-Agudo & Garcia-Martos, 2009, Odds, 2010).

*Candida* est responsable de pathologies polymorphes :

- Les candidoses cutanées sont des affections bénignes, rencontrées au niveau de tous les grands plis (intertrigos), au niveau des ongles (onyxis), et dans des zones anatomiques sensibles à l'humidité et la macération (l'aîne, les aisselles, les zones interdigitales, et sur les tissus brûlés ou écorchés).

- Les candidoses muqueuses sont les formes les plus souvent rencontrées. Elles touchent toutes les tranches d'âge ainsi que toutes les catégories sociales : de la candidose buccale du nourrisson (muguet, perlèche...), à la candidose génito-urinaire (75% des femmes présenteront un ou plusieurs épisodes de candidose vulvo-vaginale simple ou récidivante) (Fidel, 2005) en passant par la candidose œsophagienne, fréquente chez les patients sidéens.

Les signes cliniques suffisent souvent à diagnostiquer ces candidoses. Les lésions superficielles présentent un aspect caractéristique et le prélèvement du champignon permet son identification. Toutefois, elles se révèlent parfois difficiles à traiter par les thérapeutiques actuelles (polyènes et dérivés azolés) car les symptômes sont majorés par des réactions immunopathologiques, même en présence de faibles quantités de levures. De plus, les causes de récurrence, parmi lesquelles figurent les médicaments (cures répétées d'antibiotiques), les œstrogènes, les corticoïdes et immunosuppresseurs, la contraception par stérilet ou diaphragme, sont nombreuses (Clark & Hajjeh, 2002, Richardson, 2005, Conde-Rosa, *et al.*, 2010, Rodriguez, *et al.*, 2010).

- Les candidoses systémiques et disséminées (candidoses profondes) sont les plus graves et posent un réel problème. Ces infections affectent le plus souvent des patients hospitalisés, dont la prise en charge est lourde (greffés, cancéreux, prématurés...). Les espèces du genre *Candida* sont au 4<sup>ème</sup> rang des agents infectieux isolés en milieu hospitalier. Elles sont responsables d'un taux de mortalité directement attribuable d'environ 40% (Wenzel, 1995, Edmond, *et al.*, 1999, Bougnoux, *et al.*, 2008, Gomez, *et al.*, 2009).

Les candidoses profondes peuvent être d'origine endogène (Nucci & Anaissie, 2001, Galvan, 2006), c'est-à-dire consécutives au passage vers le sang et les organes profonds de levures ayant colonisé des sites digestifs et/ou génito-urinaires.

Elles peuvent aussi être la conséquence de contaminations nosocomiales "exogènes", souvent chez des patients porteurs de cathéters intra-vasculaires (produits de perfusion, transmission manuportée) (Blumberg, *et al.*, 2001, Galvan, 2006, Leroy, *et al.*, 2009).

Les facteurs de risque de candidoses systémiques sont nombreux : neutropénie prolongée, allogreffe et autogreffe de moelle, corticothérapie, chirurgie digestive lourde, réanimation, prématurité, brûlures étendues, ... (Dixon, *et al.*, 1996, Garber, 2001, Tortorano, *et al.*, 2004, Peman, *et al.*, 2005, Pfaller & Diekema, 2007, Conde-Rosa, *et al.*, 2010). *Candida* peut infecter tous les organes : reins, cœur, poumons, yeux, système nerveux, conduisant à un pronostic fatal dans 30-40% des cas (Edmond, *et al.*, 1999, Pagano, *et al.*, 2006).

Le diagnostic des candidoses profondes est difficile à établir du fait de signes cliniques non caractéristiques, de difficultés à poser un diagnostic biologique, menant fréquemment à des prescriptions empiriques. L'hémoculture est la méthode de référence pour le diagnostic de candidoses systémiques. L'isolement d'un microbe n'est pas toujours significatif de sa pathogénicité et, en particulier pour les levures, la mise en évidence de sa présence par hémoculture reste délicate. Des efforts considérables ont été consentis pour le développement d'autres méthodes de détection ou de mise en évidence d'une infection. Ainsi la détection des antigènes et/ou de métabolites de la levure par analyse sérologique, ou la détection de l'ADN spécifique par la méthode PCR, ont été mises en place (Westhead & McLain, 1964, Matthews & Burnie, 1988, Kohno, 1991, Buckley, *et al.*, 1992, Herent, *et al.*, 1992, Sendid, *et al.*, 1999, Sendid, *et al.*, 2002, Sendid, *et al.*, 2003, Sendid, *et al.*, 2004)

## **B. Les étapes de la transition colonisation/infection**

*C. albicans* possède des adhésines de surface et des ligands interagissant avec des récepteurs de l'hôte, ainsi que des affinités pour de nombreuses protéines de l'hôte (fibronectine, fibrinogène, le C3d, C3bi, la laminine).

Ces propriétés d'adhérence lui permettent de coloniser de nombreux tissus et organes. Cette étape est indispensable pour le développement des infections à *C. albicans*. Les mécanismes exacts mis en jeu lors de ce processus sont mal connus. Différentes études ont montré que la capacité de *C. albicans* à former des tubes germinatifs serait impliquée dans le processus d'adhérence. D'autre part, la levure possède une grande capacité d'adaptation : pH, sécrétions et flore bactérienne résidente (Poulain, 2003). La colonisation par *C. albicans* est tributaire de l'état de santé du patient. Celle-ci augmente avec la sévérité de la maladie et est fonction de la durée d'hospitalisation.

### 1- L'invasion tissulaire

La croissance de la forme filamenteuse, ainsi que son aptitude à digérer les tissus de l'hôte par la sécrétion d'enzymes hydrolytiques, va permettre à *C. albicans* de pénétrer dans les tissus et de s'y multiplier.

L'invasion tissulaire conduit au développement des candidoses profondes via une rupture des barrières mécaniques et/ou une altération de l'immunité de l'hôte (Calderone & Fonzi, 2001).

### 2- La dissémination hématogène

Selon l'évolution de l'invasion, *C. albicans* peut s'infiltrer jusqu'aux vaisseaux sanguins et lymphatiques, puis s'y disséminer sous forme levure. A ce stade de l'infection, la mortalité directement attribuable est de 40% (Tortorano, *et al.*, 2006).

L'hémoculture est le test de référence d'infection pour les candidoses systémiques. Cependant, seuls 20 à 50 % des prélèvements sont positifs (Einsele, *et al.*, 1997, Poulain, 2000, Poulain, 2003, Honderlick, *et al.*, 2007).

### 3- La multiplication tissulaire

*C. albicans* quitte la circulation sanguine pour coloniser des tissus et organes. L'organe cible résulte de la pathologie primaire du patient.

A titre d'exemple, chez des patients neutropéniques, *C. albicans* se réinstalle dans la rate et le foie. Il est capable d'envahir tous les tissus humains (Pittet, *et al.*, 1994).

## II. C. albicans

### A. Caractères généraux des levures

Les *Candida* appartiennent au phylum des Ascomycètes de la classe des Saccharomycètes, de l'ordre des Saccharomycetales et du groupe des Saccharomycètes mitosporiques (Calderone, 2002).

Ce genre se compose d'environ 200 espèces de levures se distinguant par leur capacité d'assimilation de certains composants, la composition polysaccharidique de leur paroi cellulaire, et par leur capacité à présenter différentes morphologies (Kirsch, *et al.*, 1990, Barnett, 2000).

Les espèces les plus fréquemment rencontrées chez l'homme sont *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* (Odds, 2000, Gutierrez, *et al.*, 2002, Segal, 2005, Tortorano, *et al.*, 2006, Pfaller & Diekema, 2007, Del Palacio, *et al.*, 2009, Odds, 2010)

*C. albicans* est une levure unicellulaire ovale (3 à 10µm) non encapsulée. Elle possède tous les organites classiques des eucaryotes, se multiplie par bourgeonnement de la blastospore à un apex particulier de la cellule, donnant naissance à une blastospore fille se détachant de la cellule mère. Elle comporte un noyau diploïde contenant huit chromosomes. Ce champignon est dimorphique. En effet, en fonction des conditions environnementales (de culture, de pH, de température), il peut prendre une forme plus allongée, cylindrique, appelée mycélium ou pseudomycélium (Fig 2).

Chez l'homme, la fréquence de portage de *C. albicans* varie selon les modalités de prélèvement, l'âge et l'état physiologique des sujets. *C. albicans* est isolé dans la cavité buccale de 2 à 70 % des individus adultes et présent dans les selles chez 8 à 20 % d'adultes (Odds, *et al.*, 1988).

## B. Organisation cellulaire

### 1- Les organites cytoplasmiques

Le cytoplasme de *Candida* contient les organites retrouvés chez les cellules eucaryotes : un noyau, une double membrane nucléaire, des mitochondries, des inclusions lipidiques...

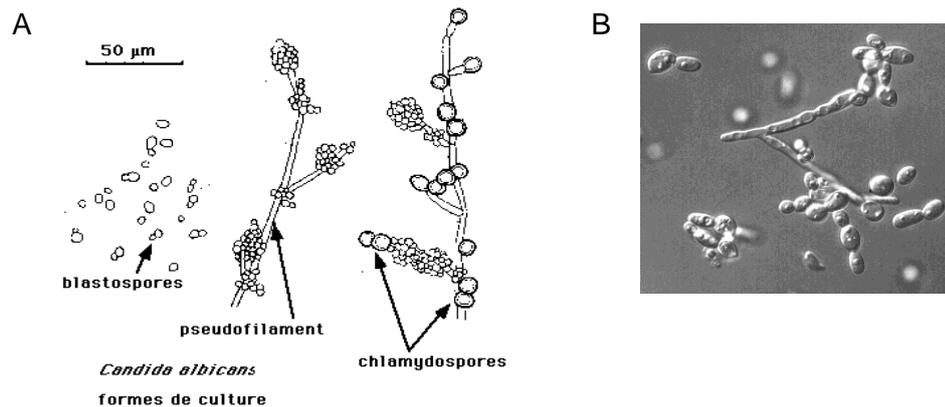


Figure 1 : A : Schémas des différentes morphologies de *C. albicans*. B : *C. albicans* observé en microscopie optique (x40).

Il possède un système vacuolo-vésiculaire important, variant selon les phases du cycle cellulaire, et qui est impliqué dans l'élaboration de la paroi (Manning & Mitchell, 1980).

*C. albicans* est un organisme diploïde possédant 8 paires de chromosomes, le plus grand étant appelé R, les suivants étant numérotés de 1 à 7 selon une taille décroissante. Son génome correspond approximativement à 16 Mb (haploïde) et code environ 6400 gènes. Le code génétique de *C. albicans* possède une particularité : le codon CUG code pour une sérine et non pour une leucine (Santos, *et al.*, 1993).

### 2- Membrane plasmique

Constituée de deux feuillets membranaires, la membrane plasmique a un rôle de transport actif d'acides aminés, d'oses et de différents ions, ainsi qu'un rôle passif dans la régulation de flux moléculaires, servant à maintenir la pression osmotique.

Cette membrane est également impliquée dans le processus de transport des molécules et de biosynthèse des constituants de la paroi. Il y siège ainsi de nombreuses enzymes comme les chitines synthases, les glucanes synthases, les glycosyl et mannosyl transférases, les ATPases et les phospholipases.

La membrane plasmique est recouverte d'une paroi qui donne à la cellule sa forme et sa stabilité mécanique.

### 3- La paroi

La paroi et ses constituants (Fig 3) jouent un rôle important dans les mécanismes de reconnaissance de la levure par l'hôte (Poulain & Jouault, 2004, Jouault, *et al.*, 2009). En effet, elle est le point de contact/d'échange avec l'hôte, mais aussi de communication avec l'extérieur. C'est un déterminant antigénique puissant responsable de l'adhérence de la levure à l'hôte (Calderone, 1993, Chaffin, *et al.*, 1998, Sundstrom, 2002, Gozalbo, *et al.*, 2004, Ruiz-Herrera, *et al.*, 2006).

C'est une structure complexe et dynamique représentant 15 à 20% du poids sec de la cellule. Sa composition particulière lui fournit une protection contre les agressions physiques, chimiques, biologiques, et détermine sa morphologie. Elle est formée en grande partie de polysaccharides (90%), protéines et lipides (Reiss, *et al.*, 1992).

Plusieurs couches ont été identifiées :

- Une couche interne constituée de mannoprotéines enzymatiques et structurales
- Une couche intermédiaire composée de  $\beta$ -glucanes et de chitine (Klis, 1994), ainsi que de protéines ancrées GPI et de protéines Pir (Proteins with Internal Repeats) (Kapteyn, *et al.*, 1999).
- Une couche externe formée de mannoprotéines enzymatiques, structurales, du phosphopeptidomannane (PPM ou mannane) et du phospholipomannane (PLM) (Poulain, *et al.*, 2002).

La levure est capable de modifier l'organisation de sa paroi en fonction de son environnement et des différentes phases de son cycle cellulaire (Smits, *et al.*, 2001).

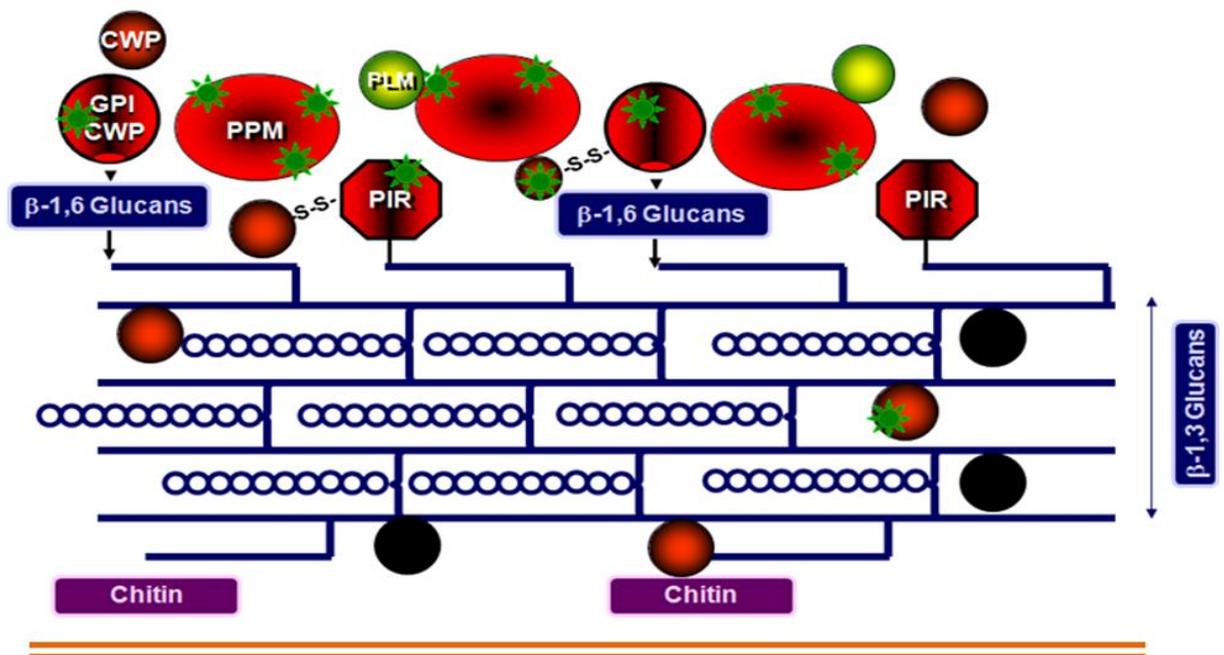


Figure 2 : Représentation schématique de la paroi de *C. albicans* adaptée de Smits, *et al.* 2001 par D. Poulain.

Un réseau de polysaccharides liés par des liaisons covalentes est responsable de la résistance chimique et mécanique de la paroi. Il est constitué de chitine (■) dans les couches les plus profondes, de β-1,3 glucanes plus (○○) ou moins (—) denses et de β-1,6 glucanes (■) dans les couches intermédiaires.

A ce réseau sont associées des protéines (●), également liées de manière covalente. Il en existe deux types : les protéines dont un résidu d'ancrage GPI (●) est associé aux β-1,6 glucanes (protéines Pga-Produced GPI-anchored proteins), et les protéines dites pir (proteins with internal repeats) associées aux β-1,3 glucanes.

Certaines protéines sont très probablement reliées entre-elles par des ponts disulfures (S-S). D'ailleurs, la paroi est le lieu de transit de nombreuses protéines enzymatiques sécrétées, alors que plusieurs rapports font état de la présence de protéines considérées comme cytoplasmiques, décrites comme « sécrétées de manière non conventionnelle ».

La surface de la paroi est recouverte de phosphopeptidomannane (PPM) non lié de manière covalente.

A la manière du PPM, mais de façon moins importante, la très grande majorité des protéines pariétales de *S. cerevisiae* et de *C. albicans* fait l'objet de modifications post-

traductionnelles, leur associant des  $\alpha$ -mannosides par des liaisons N ou O-glycosidiques, représentées sur ce schéma en rouge (●)

Conjointement à ces alpha-mannosyls, *C. albicans* est capable de synthétiser des  $\beta$ -mannosyls représentés sur ce schéma en vert (★). Ces béta-mannosyls sont associés concurremment aux alpha-mannosyls dans le PPM, tandis qu'ils sont exprimés de manière élective dans un glycolipide sécrété et associé de manière non covalente à la surface pariétale dénommé phospholipomannane (PLM) (Trinel, *et al.*, 1993).

#### 4- La chitine et les $\beta$ -glucanes

La chitine (0,6 à 2,7% du poids sec de la paroi) est un polysaccharide linéaire formé de plus de 200 à 400 unités de N-acétylglucosamine liées par des ponts  $\beta$ -1,4. Les chaînes de chitine sont associées entre-elles pour constituer des microfibrilles. Sa distribution au sein du squelette pariétal est aléatoire et varie en fonction du cycle cellulaire (Braun & Calderone, 1978).

Ainsi, la chitine est retrouvée lors de la formation des septa pendant la croissance du bourgeon et sa séparation. Elle a un rôle important dans la réparation des dommages de la paroi (Kapteyn, *et al.*, 2000).

La chitine est associée à un réseau de glucanes. Ceux-ci sont constitués de résidus de glucose liés en  $\beta$ -1,3 et en  $\beta$ -1,6, représentant 48 à 60% du poids sec de la paroi (Bishop, 1960, Gozalbo, *et al.*, 2004). La chitine et les  $\beta$ -glucanes sont ainsi à l'origine d'un réseau très dense, déterminant la forme de la cellule ainsi que sa rigidité.

Des associations entre les  $\beta$ -glucanes et des glycoprotéines enzymatiques, telles que l'invertase, ou des liaisons covalentes au sein de la paroi entre les résidus mannose du core des ancres GPI et les  $\beta$ -1,6 glucanes ont été mises en évidence.

#### 5- Les mannoprotéines

Les mannoprotéines (30 à 40% de la paroi) déterminent les propriétés de surface, permettant à *C. albicans* d'adhérer aux tissus de l'hôte (Chaffin, *et al.*, 1998).

Elles peuvent être structurales, participant au maintien du squelette cellulaire par leur association avec la chitine et les  $\beta$ -glucanes (Kapteyn, *et al.*, 2000).

Deux types de protéines pariétales sont retrouvés :

- les protéines liées aux  $\beta$ -1,3 glucanes par l'intermédiaire d'une molécule  $\beta$ -1,6 glucanes via une ancre GPI (glycosylphosphatidylinositol)
- les protéines Pir (Protein with internal repeats) branchées directement aux  $\beta$ -1,3glucanes

Les mannoprotéines peuvent aussi être enzymatiques (hydrolases, lipases), contribuant à l'élaboration et aux modifications de la paroi, ou permettant la digestion des substrats dont la cellule a besoin pour sa croissance. Elles possèdent également une fonction majeure dans les processus de transition morphologique (Ruiz-Herrera, *et al.*, 2006).

#### 6- Le phosphopeptidomannane

La couche la plus externe de la paroi est formée par le phosphopeptidomannane ou mannane (Fig 4). Cet édifice complexe de masse moléculaire élevée, associe des mannoses et du phosphate à des protéines dites matricielles, intégrées de manière non covalente à la paroi.

Cet enchaînement complexe de résidus mannosidiques est associé à des protéines par des liaisons O-glycosidiques ou N-glycosidiques (Suzuki, 1991).

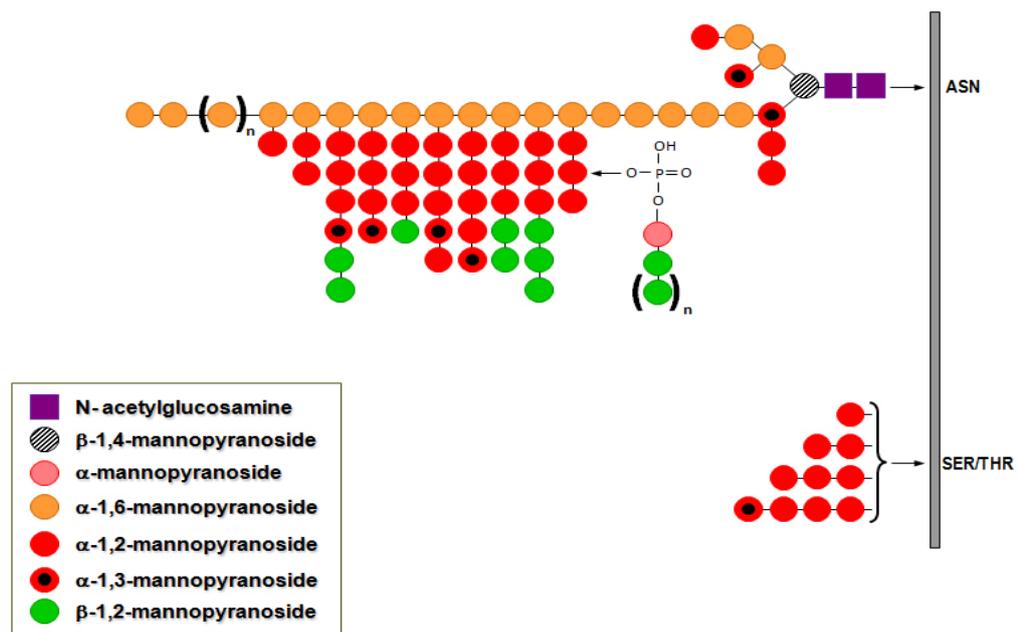


Figure 3 : Schéma de la structure du mannane de *C. albicans*

Au sein des structures N-glycosylées, on distingue deux fractions d'oligomannosides en fonction de leur sensibilité à l'hydrolyse acide.

La première, appelée « acide stable », car résistante à l'HCl, est constituée d'une chaîne linéaire de résidus de mannose liés en  $\alpha$ -1,6, sur lesquels sont branchées des chaînes latérales de mannose liés en  $\alpha$ -1,2, parfois en  $\alpha$ -1,3 (Suzuki, *et al.*, 1982) ou  $\beta$ -1,2 (Shibata, *et al.*, 1985).

Le sérotype de souches de *C. albicans* est déterminé par la présence (sérotype A) ou l'absence (sérotype B) de ces résidus mannose terminaux liés en  $\beta$ -1,2, appelés antigène 6 (Suzuki, 1995).

A cette fraction stable est liée par l'intermédiaire d'une liaison phosphodiester, une fraction « acide labile », sensible à l'HCl, formée d'une chaîne de mannoses liés en  $\beta$ -1,2 (Suzuki, 1991, Trinel, *et al.*, 1997) (Fig 5).

## 7- Les lipides et glycolipides

La paroi possède aussi une composante lipidique (7% du poids sec de la paroi), regroupant des phospholipides, des triglycérides et des stérols (Ghannoum, *et al.*, 1987).

Ils ont un rôle important dans la signalisation cellulaire et l'élaboration de la paroi. Parmi ceux-ci, le phospholipomannane (Fig 5) est un glycolipide de structure originale dont la

copule polysaccharidique présente exclusivement des  $\beta$ -1,2 oligomannosides (Trinel, *et al.*, 1993, Trinel, *et al.*, 1999).

Sa partie glycanique est constituée d'une chaîne linéaire de 2 à 18 résidus de  $\beta$ -1,2 oligomannosides. Sa partie lipidique est formée d'une phytosphingosine (C18 ou C20) associée à un acide gras C24-C26 hydroxylé ou non.

La composition de la fraction lipidique est dépendante de la température (Trinel, *et al.*, 2002). Le degré de polymérisation de la fraction glycanique est spécifique du sérotype de la souche de *C. albicans* (Trinel, *et al.*, 2002, Trinel, *et al.*, 2005).

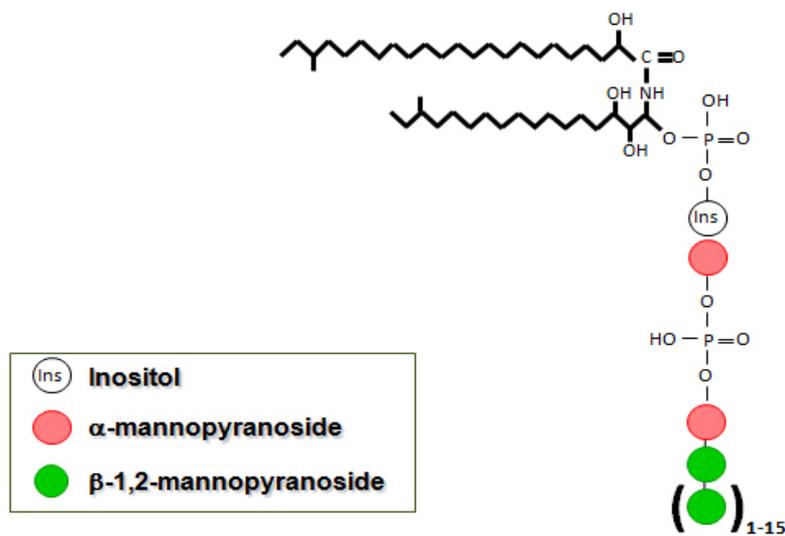


Figure 4 : Structure schématique du phospholipomanne (PLM) de *C. albicans*

Cette structure lui confère des propriétés hydrophiles lui permettant de diffuser dans la paroi (Poulain, *et al.*, 2002).

L'analyse du PLM de différentes souches de *Candida* a montré que ce glycolipide n'est exprimé que chez *C. albicans* et *C. tropicalis*, les deux espèces les plus pathogènes du genre *Candida* (Cantelli, *et al.*, 1995).

### III. Mécanismes de pathogénicité de *C. albicans*

#### A. Rôle de la paroi de *C. albicans*

La paroi de *C. albicans* est le point de contact principal avec l'hôte. Son implication dans la pathogénicité est manifeste.

La couche externe de la paroi de *C. albicans* est constituée du mannane et de mannoprotéines, formant un matériel dense visible en microscopie électronique et constitué d'appendices fibrillaires. Les glycoprotéines présentes sur les fibrilles fournissent le contact initial entre *C. albicans* et son hôte (Tokunaga, *et al.*, 1990), ou à des protéines de celui-ci comme le fibrinogène, les fragments du complément (Gelfand, *et al.*, 1978, Tokunaga, *et al.*, 1990, Han, *et al.*, 2001, Tsoni, *et al.*, 2009).

Des travaux (Yu, *et al.*, 1994, Yu, *et al.*, 1994) ont démontré que ces fibrilles interviennent dans l'adhérence de *C. albicans* en se liant à un récepteur lipidique, le glycosphingolipide lactosylcéramide, présent au niveau des cellules épithéliales buccales. L'épitope présent sur les fibrilles, agissant dans la liaison aux récepteurs cellulaires, est identique à celui présent au niveau des pili de la bactérie *Pseudomonas aeruginosa*. Celui-ci joue un rôle dans l'adhérence de cette bactérie aux cellules épithéliales buccales humaines (Lee, *et al.*, 1996, Yu, *et al.*, 1996).

Beaucoup d'autres composés fongiques de la paroi ont été trouvés comme étant impliqués dans les premières étapes de l'infection. Par exemple, le déterminant spécifique du sérotype A, le facteur 6, est impliqué dans l'adhérence de la levure aux cellules épithéliales et endothéliales (Hostetter, 1994). Des travaux montrent qu'un mutant délété pour cet épitope adhère plus difficilement sur des cellules épithéliales (Miyakawa, *et al.*, 1989, Miyakawa, *et al.*, 1992).

Outre ces glycoprotéines, le mannane (Boxx, *et al.*, , Kanbe, *et al.*, 1993, Kanbe & Cutler, 1994), les mannoprotéines (Li & Cutler, 1993), des structures de type glycosphingolipide (Yu, *et al.*, 1994, Yu, *et al.*, 1994), des composants de nature lipidique (Ghannoum, *et al.*, 1987), mais aussi la chitine ont été directement impliqués dans la pathogénèse de *C. albicans*.

## **B. Facteurs associés à la virulence de *C. albicans***

### 1. Le dimorphisme

La transition morphologique entre la forme levure et le mycélium est l'un des facteurs de virulence le plus étudié chez *C. albicans*. Elle dépend de facteurs environnementaux tels que le pH, la température et la source de carbone (van Burik & Magee, 2001). La protéine Efg1p tient un rôle majeur dans le contrôle de cette transition (Gozalbo, *et al.*, 2004).

Des études ont démontré qu'une relation existait entre transition levure-mycélium et virulence. En effet, c'est grâce à la forme mycélienne que *C. albicans* échappe aux macrophages lors de la phagocytose contrairement à *S. cerevisiae* qui est éliminé (Lorenz & Fink, 2002). Un double mutant *atc1Delta/atc1Delta* dont la capacité à former des hyphes est réduite est moins virulent que les souches parentales et hétérozygotes dans un modèle murin de candidose systémique (Pedreno, *et al.*, 2007).

De plus, des travaux réalisés par Lo *et al* indiquent que les deux formes sont liées à la pathogénèse. Des mutants incapables de « switching » soit sous forme levure (Cph1, Efg1 ou la cycline Hgc1), ou inversement soit sous aspect filament (n'exprimant pas le répresseur Tup1) sont avirulents chez la souris et plus sensibles à l'endocytose par les macrophages (Lo, *et al.*, 1997, Marcil, *et al.*, 2002, Zheng & Wang, 2004, Bastidas & Heitman, 2009).

Cependant, le dimorphisme n'est pas un facteur de virulence « en soi » mais est fort probablement associé à d'autres.

### 2. Adhérence

L'une des étapes importante lors de l'infection et la colonisation par *C. albicans* est son adhérence aux cellules et tissus de l'hôte.

*C. albicans* est capable de se fixer à de nombreux types cellulaires via les adhésines comme les cellules épithéliales, endothéliales (Fu, *et al.*, 1998, Zhao, *et al.*, 2004, Lima-Neto, *et al.*, 2009) et les plaquettes (Robert, *et al.*, 1991). Il est aussi doué pour s'attacher à certaines protéines de l'hôte dont le complément (Calderone, 1993), la fibronectine (Klotz, *et al.*, 1994), le fibrinogène (Annaix, *et al.*, 1990) ou encore sur des matériaux inertes (Douglas, 2003, Gedik & Ozkan, 2009, Kurtulmus, *et al.*) tels que des prothèses et des cathéters.

Des systèmes complexes d'interaction de type ligand-récepteur, des mécanismes non spécifiques mettant en jeu l'hydrophobicité de la levure, ou du support et les liaisons électrostatiques ont pu être mis en évidence.

Les adhésines regroupent des molécules multiples et diverses. Ce sont majoritairement des mannoprotéines :

- Des protéines de type lectinique : (Critchley & Douglas, 1987, Brassart, *et al.*, 1991) des lectines de la paroi fongique se lient à des glycoprotéines de surface des cellules épithéliales, contenant du fucose ou de la *N*-acétyl-D-glucosamine. En effet, l'adhérence de *C. albicans* à des cellules épithéliales peut être partiellement inhibée lorsque les levures sont pré-incubées avec du fucose, de la *N*-acétyl-D-glucosamine, ou avec des lectines qui reconnaissent un de ces deux sucres (Tosh & Douglas, 1992).

- Des protéines de type intégrine et des protéines RGD (présentant une séquence consensus Arginine, Glycine, Acide aspartique)

Parmi celles-ci, la famille des *ALS* (*Agglutinin-like sequence*) (Hoyer, 2001, Hoyer, *et al.*, 2001, Hoyer & Hecht, 2001, Hoyer, *et al.*, 2008) a été mise en évidence, particulièrement les adhésines Als1p et Als3p permettant l'adhérence de *C. albicans* aux cellules endothéliales vasculaires et aux cellules épithéliales buccales (Fu, *et al.*, 1998, Zhao, *et al.*, 2004, Phan, *et al.*, 2007). L'adhésine Hwp1 de *C. albicans* s'est également révélée importante lors d'infections des muqueuses buccales et oesophagiennes (Balish, *et al.*, 2001, Sundstrom, 2002), et l'adhésine Camp65p jouerait un rôle crucial lors d'infection vaginale (Bromuro, *et al.*, 1994, Nisini, *et al.*, 2001), ainsi que dans l'adhérence à un support inerte (De Bernardis, *et al.*, 2007, Sandini, *et al.*, 2007).

### 3. Enzymes hydrolytiques et autres protéines

L'implication de protéases dans le processus d'adhérence a été particulièrement étudiée chez *C. albicans*, notamment les aspartyl protéinases ou SAPs. D'autres enzymes sont sécrétées comme les phospholipases (PLs) et les lipases (LIPs).

#### Les aspartyl protéinases

Cette famille comporte dix membres dont les Sap1-8, sécrétées dans l'espace extracellulaire et les Sap9-10, attachées à la paroi par une ancre GPI.

Ces isoenzymes ont une activité optimale à pH acide et sont inhibées par la pepstatine. Chacune des Saps est régulée différemment en fonction des conditions physiologiques et environnementales (Hube, 2000).

Leur activité protéolytique n'a été retrouvée *in vitro* que chez des souches pathogènes de *Candida* : *C. albicans*, *C. tropicalis* (Monod, *et al.*, 1994, Zaugg, *et al.*, 2001), *C. dubliniensis* (Gilfillan, *et al.*, 1998), *C. parapsilosis* (de Viragh, *et al.*, 1993, Fusek, *et al.*, 1993).

De nombreux travaux indiquent qu'elles ont un rôle prépondérant dans différents aspects du processus infectieux (Hube & Naglik, 2001, Naglik, *et al.*, 2003, Schaller, *et al.*, 2005).

Sap2 est impliquée dans la dégradation de la matrice extracellulaire et les protéines de surface de l'hôte telles que le collagène, la laminine, la fibronectine ainsi que des protéines inflammatoires telles que la lactoferrine, les IgA (Hube, 1996, Beausejour, *et al.*, 1998).

Schaller *et al.* ont montré dans un modèle *in vitro* de candidose buccale utilisant un épithélium humain reconstruit, que Sap1, Sap2 et Sap3 mais pas les Sap4, 5, 6, étaient impliquées dans les premières étapes de la pénétration des surfaces muqueuses et dans l'induction des dommages tissulaires (Schaller, *et al.*, 1999, Schaller, *et al.*, 2000, Schaller, *et al.*, 2003, Schaller, *et al.*, 2003).

L'utilisation d'anticorps monoclonaux humains dirigés à la fois contre Sap2 et contre l'adhésine Camp65p a permis d'inhiber complètement l'adhérence des levures à des cellules épithéliales vaginales de rat cultivées *in vitro*. Ces anticorps utilisés en lavement, dans un but préventif et curatif, se sont avérés aussi efficaces *in vivo* que le fluconazole, dans un modèle de vaginite chez le rat (De Bernardis, *et al.*, 2007).

#### Les phospholipases :

Les phospholipases sont des enzymes ayant la capacité d'hydrolyser une ou plusieurs liaisons ester des glycérophospholipides.

Différentes sous-classes de phospholipases ont été caractérisées chez *C. albicans* : PLA (Banno, *et al.*, 1985), PLB (Barrett-Bee, *et al.*, 1985, Hoover, *et al.*, 1998), PLC (Pugh & Cawson, 1977) et PLD (Hube, *et al.*, 2001). La principale activité phospholipasique est attribuée à PLB.

Les fonctions des phospholipases durant une infection à *C. albicans* ne sont pas précisément connues, mais sont impliquées dans la pénétration de différentes cellules de l'hôte (Pugh & Cawson, 1977, Ma, *et al.*, 2009), l'adhérence aux cellules épithéliales (Barrett-Bee, *et al.*,

1985), l'invasion d'un épithélium oral humain reconstitué (Jayatilake, *et al.*, 2005) et peut être dans l'interaction avec les voies de transduction de l'hôte (Filler, *et al.*, 1991, Schaller, *et al.*, 2005).

### Les lipases

L'activité lipasique extracellulaire des espèces pathogènes de *Candida* a été décrite par Werner *et al.* (Werner, 1966). Une estérase sécrétée a été caractérisée plus tard par Tsuboi *et al.* (Tsuboi, *et al.*, 1996).

Les lipases sont caractérisées par leur capacité à catalyser l'hydrolyse des liaisons ester des mono-, di- et triacylglycérols et même des phospholipides. Ces protéines sont codées par une famille de gènes constituée d'au moins dix membres (LIP1-10). Des travaux ont montré que les lipases sont plus ou moins exprimées en fonction des conditions environnementales (Hube, 2000, Hube, *et al.*, 2000), de l'origine et du stade de l'infection (Stehr, *et al.*, 2004). Il a été montré qu'elles étaient impliquées dans la pathogénèse de *C. albicans* (Gacser, *et al.*, 2007, Paraje, *et al.*, 2009).

#### 4.« switching » ou phénotype alternatif

*C. albicans* est capable de changer son phénotype en transformant l'aspect de ces colonies (Soll, 1992). En effet, un changement réversible s'opérant fréquemment s'effectue pour mener dans 99,9% des cas à un phénotype standard dit « smooth » (colonies blanches), et dans 0,001% à un phénotype original dit « opaque » (grandes colonies grises) (Slutsky, *et al.*, 1987).

Le phénotype « opaque » présente des différences au niveau des propriétés de surface, de l'expression de certains gènes codant pour des molécules considérées comme facteur de virulence, ou impliqués dans la susceptibilité aux antifongiques azolés et à sensibilité accrue à la température (Slutsky, *et al.*, 1987, Soll, *et al.*, 2003).

De plus, Kvaal *et al* ont montré que ces levures colonisent plus efficacement la peau que les levures avec un phénotype « smooth », dans un modèle murin d'infection cutanée, et que les souches isolées de patients présentent une plus grande fréquence de « switching » que les souches commensales (Kvaal, *et al.*, 1999).

Cette apparition de phénotypes alternés programmés est importante au niveau de la pathogénicité, car elle sous entend qu'une même souche est capable de s'adapter aux exigences de son environnement, en échappant à la pression de sélection.

A l'exemple de *C. neoformans*, les différents phénotypes qu'il peut adopter sont de virulence variable : le phénotype « wrinkled » est plus virulent que le phénotype pseudohyphal, lui-même plus virulent que la forme « smooth » (Fries, *et al.*, 1999, Guerrero, *et al.*, 2006, Jain, *et al.*, 2006).

D'autre part, il a été démontré que le « switching » que présente *C. albicans* est contrôlé par MTL (mating type locus), homologue au locus MAT de *S. cerevisiae*, impliqué dans la conjugaison. Ainsi, le « mating » est dépendant du « switching » (Hull & Johnson, 1999, Hull, *et al.*, 2000, Miller & Johnson, 2002, Soll, 2004).

### 5. Formation de biofilm

Les biofilms sont définis comme une communauté microbiologique attachée à une surface, entre-eux, encastrés dans une matrice de matériel exopolymérique.

Le biofilm mature affiche une structure tridimensionnelle complexe avec une hétérogénéité spatiale. Il a pour but une optimisation des influx de nutriments, de l'élimination des déchets et l'établissement d'une niche microbiologique. Ils sont impliqués significativement dans les infections nosocomiales humaines.

Les dispositifs médicaux tels que prothèses, implants, tubes endo-trachéaux, pacemakers, cathéters, ont tous été identifiés comme pouvant être le support de colonisation et de biofilm par *Candida* (Kojic & Darouiche, 2004, Uppuluri, *et al.*, 2009, Uppuluri, *et al.*, 2009). *C. albicans* reste l'espèce fongique la plus souvent associée à la formation de biofilm (Douglas, 2002, Douglas, 2003).

L'élaboration de biofilm sur ces dispositifs entraîne une augmentation de la résistance aux antifongiques. Elle est un réservoir continu d'infection, capable de résister aux défenses immunitaires de l'hôte (Lopez-Ribot, 2005, Uppuluri, *et al.*, 2009).

Différents mécanismes peuvent être responsables de cette résistance intrinsèque : la haute densité cellulaire dans le biofilm, les effets de la matrice du biofilm, la diminution du taux de croissance et limitation des nutriments, l'expression de gènes de résistance (les pompes à efflux) et la présence de cellules persistantes.

La formation du biofilm se déroule en plusieurs étapes (Hawser & Douglas, 1994). Tout d'abord, les levures adhèrent à la surface via des facteurs non-spécifiques (hydrophobicités de surfaces etc...) et spécifiques (reconnaissance de ligands tel que

fibrinogène (Chaffin, *et al.*, 1998). L'attachement initial est suivi 3 à 6h par la formation de germe tube puis 24 à 48h, de la prolifération d'hyphes, de pseudo-hyphes et du développement d'une matrice polymérique extracellulaire. Enfin, les levures générées à la surface du biofilm sont relâchées pour la dissémination dans l'organisme (Blankenship & Mitchell, 2006).

Les hyphes sont responsables de l'architecture et tiennent une place importante dans le biofilm. En effet, des travaux réalisés sur des mutants délétés dans des gènes impliqués dans la filamentation (*cph1/efg1*), indiquent que les mutants sont incapables de coloniser des cathéters recouverts de plasma (Ramage, *et al.*, 2002).

## 6. Quorum Sensing

Depuis une vingtaine d'années, des études ont montré que les bactéries étaient capables de sécréter des molécules de signaux intercellulaires, appelées quorum sensing.

En 2001, Hornby *et al* ont décrit le même phénomène chez *C. albicans*, au cours duquel un composé lipophile introduit dans le milieu, permettait d'empêcher la transition blastospore/mycélium (Hornby, *et al.*, 2001). Ce composé a été identifié comme étant le farnesol (Oh, *et al.*, 2001, Hornby & Nickerson, 2004). D'autres composés ont été identifiés comme le 2-phényléthanol, le tryptophol (Lingappa, *et al.*, 1969, Chen & Fink, 2006), MARS (Hazen & Cutler, 1979, Hazen & Cutler, 1983), le tyrosol (Chen, *et al.*, 2004, Nickerson, *et al.*, 2006).

Le rôle de ces molécules dans la pathogénicité de *C. albicans* est peu connu mais vraisemblable. Des expériences de Navarathna *et al* démontrent que l'addition de farnesol exogène dans un modèle murin de candidose systémique, augmente la virulence (Navarathna, *et al.*, 2007). De plus, il renforcerait l'infection en induisant une réponse de type Th2 (Navarathna, *et al.*, 2007). Des travaux de Saidi *et al* indiquent que le farnesol est un inhibiteur de la croissance de *C. albicans*, dans un modèle *in vitro* de fibroblastes gingivaux humain (Saidi, *et al.*, 2006). Une étude sur le tyrosol révèle qu'il s'agit d'un composé anti-oxydant protégeant *C. albicans* des neutrophiles (Cremer, *et al.*, 1999).

## **IV. Réponse immunitaire contre *C. albicans***

### **A. Immunité innée**

*C. albicans* possède de nombreux facteurs de virulence ayant une place essentielle dans l'infection de l'hôte. Cependant, le statut immunologique tient une part non négligeable dans la maladie.

Le développement de l'infection par *C. albicans* dépend de l'équilibre entre le statut immunologique de l'hôte et les facteurs de virulence exprimés par le champignon.

Après avoir franchi les premières barrières de défense comme l'épiderme, les micro-organismes sont pris en charge par le système immunitaire. En fonction du point d'entrée, des cellules sentinelles, situées au niveau sous-épithélial, vont se confronter aux micro-organismes, élaborer seules ou en collaboration avec d'autres cellules une réponse non spécifique, immédiate, ou dans les quelques instants suivants l'exposition à l'antigène. Il s'agit de la réponse immunitaire innée. Elle implique un grand nombre de cellules : des cellules plus au moins phagocytaires (neutrophiles, macrophages et CD), des cellules qui secrètent des médiateurs inflammatoires (basophiles, éosinophiles et mastocytes), les cellules « natural killer » ou NK, des molécules comme les protéines du complément, les protéines de la phase aigue et les cytokines.

Cette réponse non spécifique est suivie d'une réponse plus tardive, beaucoup plus spécifique nommée immunité adaptative ou acquise. Cette réaction est basée sur la reconnaissance d'antigène spécifique du pathogène par les lymphocytes et l'établissement d'une mémoire à ces antigènes. Elle fait intervenir les lymphocytes et les anticorps.

#### 1.1.Barrières externes

Les surfaces épithéliales externes et internes représentent les premières lignes de défense contre l'infection constituant une barrière physique efficace. Elles empêchent les micro-organismes de pénétrer dans le corps humain. La compétition des agents pathogènes avec la flore normale bactérienne présente sur ces barrières externes, ainsi que la production de substances antimicrobiennes les rendent encore plus efficaces (Calderone, 2002, Delves P., 2006).

De plus, des astuces ont été développées pour entraver la pénétration des microbes : salive, mouvements ciliaires, toux, exposition UV, pH faible, sécrétions sébacées, etc... Les cellules de Paneth, localisées au fond des glandes de Lieberkühn du tractus intestinal, sécrètent du lysozyme intestinal et des  $\alpha$ -défensines. La peau et le tractus respiratoire produisent les  $\beta$ -défensines. Chez l'homme, ces petits peptides, possédant un large spectre d'activité antimicrobienne, ont un rôle prépondérant dans les pathologies infectieuses et modulent la réponse inflammatoire (Janeway, 2003, Lehrer, 2004, Schneider, *et al.*, 2005). Il a été prouvé que la colonisation par *C. albicans* est augmentée lorsque la flore normale est modifiée par des traitements à base d'antibiotiques à large spectre (van der Waaij, 1984, Calderone, 2002, Tortorano, *et al.*, 2004, Koh, *et al.*, 2008). De plus, des travaux ont montré que les  $\beta$ -défensines sont induites par la levure (Meyer, *et al.*, 2004) et sont pourvues d'une puissante activité fongicide (Vylkova, *et al.*, 2007).

## 1.2. Activation du complément (C3, MBL)

Le système du complément est un ensemble d'une vingtaine de protéines plasmatiques thermolabiles, dont l'action complémentaire des anticorps participe à la destruction d'agents pathogènes. L'activation du complément est un phénomène très rapide : les protéines du complément sont produites en permanence, sous forme inactive, et s'activent par clivage ou polymérisation entre-elles, créant un mécanisme d'amplification en cascade. Les principaux éléments du C possèdent une activité convertase, c'est à dire qu'ils transforment les formes inactives en formes actives. La molécule C3, présente dans le plasma, a une fonction essentielle dans le système complément.

Le système complément peut être activé par trois voies différentes :

- Voie classique activée par le complexe antigène-anticorps. La fixation de deux ou plusieurs immunoglobulines d'IgG ou une molécule d'IgM, à la surface d'un micro-organisme, permet à leur région Fc de fixer le premier composant de la voie classique: C1.
- Voie alterne est stimulée par les surfaces cellulaires des bactéries gram+ ou gram-, quelques cellules infectées par un virus, levures et parasites. La voie alterne d'activation résulte de la fixation du C3b sur un site accepteur présent à la surface du microorganisme.
- Voie des MBL : la Mannose Binding Protein (MBP) de la famille des collectines, peut interagir avec les résidus de mannose ou N-acetylglucosamine (GlcNac) des microorganismes. Sa structure est homologue au C1q. Sa fixation, sur des mannoses des

bactéries, stimule deux serine protéases MASP1 et MASP2 ou MASP3 qui clivent et activent C4 et C2, rejoignant ainsi la voie classique.

Le système du complément a une fonction importante dans la protection contre les infections fongiques (Han, *et al.*, 2001). *C. albicans* est capable d'activer la voie classique de même que la voie alterne du complément (Kozel, 1996). Des travaux effectués à partir de souris KO pour la protéine C3 indiquent qu'elle est essentielle pour la résistance aux infections à *C. albicans* et *C. glabrata*. En effet, la clairance des levures est détériorée contrairement à la réponse inflammatoire (Tsoni, *et al.*, 2009). De plus, l'anaphylotoxine C3a (produit de dégradation du C3) et les peptides dérivés du C3a se lient à la membrane de *Candida*, conduisant à des perturbations membranaires menant à la lyse de la levure (Sonesson, *et al.*, 2007). D'autre part, des études indiquent l'importance de la MBL pour l'opsonisation et la phagocytose (Holmskov, *et al.*, 2003, Brouwer, *et al.*, 2008).

La molécule C3b se lie directement à la surface de *C. albicans* (AP activation) ou via des anticorps anti-mannane présents naturellement dans le sérum humain (voie classique d'activation) (Zhang & Kozel, 1998). Les techniques d'immunofluorescence réalisées *in vivo* ont permis de mettre en évidence un récepteur C3bi à la surface de *C. albicans* (*CR3-like*). Ainsi, la levure est capable de se lier directement à certaines sous unités du complément fonctionnel. Un récepteur (*CR2-like*) fixant le C3d a aussi été identifié (Calderone, *et al.*, 1988, Wadsworth, *et al.*, 1993).

#### a. Phagocytose

Les cellules capables de phagocyter et de détruire les microorganismes, opsonisés ou non, sont principalement les neutrophiles et les macrophages (Janeway, 2003, Delves P., 2006).

#### Les neutrophiles

Les polynucléaires neutrophiles représentent à eux seuls environ 65 % de l'ensemble des leucocytes du sang, et 99 % des granulocytes. Ils constituent la première ligne de défense contre les infections à *Candida*. Les patients neutropéniques sont plus exposés aux candidoses (Aratani, *et al.*, 1999, Aratani, *et al.*, 2002).

Suite au contact avec un microorganisme opsonisé ou non, le neutrophile englobe celui-ci à l'intérieur d'une vacuole phagocytaire, appelé phagosome. Ensuite, les granules intracellulaires fusionnent avec le phagosome pour constituer le phagolysosome. A l'intérieur de celui-ci, l'agent pathogène est détruit par une combinaison de mécanismes

oxydatifs et non-oxydatifs (Diamond, *et al.*, 1980, Mansour & Levitz, 2002, Faurschou & Borregaard, 2003, Nathan, 2006). Les  $\alpha$ -defensines ont une action notable contre les levures (Joly, *et al.*, 2004).

De plus, il a été récemment décrit un nouveau mécanisme antifongique, indépendant de la phagocytose du pathogène, dénommé « NETs » ou neutrophil extracellular traps. Les neutrophiles activés par différents stimulus (cytokines, lipopolysaccharide, phorbol myristate acétate) sont capables de former des filaments extracellulaires composés d'ADN, d'histones et de protéines comme l'élastase, la cathepsine G, la lactoferrine et la gélatinase, issues des granulations primaires et secondaires. Ces « filets » se lient aux bactéries à Gram positif et à Gram négatif, les piègent et exercent une activité bactéricide extracellulaire à distance sans même les englober (Urban & Zychlinsky, 2007). Des travaux ont montré que *C. albicans* était capable d'induire la formation des NETs que ce soit sous forme levure ou mycélienne (Urban, *et al.*, 2006).

### Les macrophages

Les macrophages (du grec : « gros mangeur », makros = grand, phagein = manger) sont des phagocytes, découverts par Elie Metchnikoff en 1883. Ils proviennent de la différenciation de leucocytes sanguins, les monocytes. Les monocytes et les macrophages participent à l'immunité innée en tant que défense non-spécifique mais sont capables de participer à l'immunité adaptative. Leur rôle est de phagocyter les débris cellulaires, les pathogènes et de détruire le pathogène via le relargage de substances microbicides (protéases, dérivés activés de l'oxygène et d'enzymes lysosomiales) mais aussi de moduler la réponse immunitaire : initiation par présentation antigénique et sécrétion de médiateurs (cytokines, chimiokines, prostaglandines). C'est pourquoi, ils sont munis d'une multitude de récepteurs (récepteur du fragment C3b du complément, pour le fragment Fc des IgG, etc...) à leur surface leur permettant de discriminer les pathogènes.

Les macrophages jouent un rôle central dans la lutte contre les infections à *C. albicans* (Calderone, 2002).

### Les cellules dendritiques

Les CD font partie du système réticulohistiocytaire qui présente des dendrites. Ces cellules phagocytaires expriment un large éventail de récepteurs permettant de détecter la présence de pathogène et elles font partie des cellules présentatrices d'antigène. Elles ont deux fonctions principales. D'une part, les initiations de la réponse immunitaire adaptative dont les acteurs principaux sont les lymphocytes T et lymphocytes B, dirigés contre des antigènes du « non-soi ». D'autre part, elles tiennent une fonction importante dans le maintien de la tolérance centrale au « soi », dans le thymus, processus impliquant les Lymphocytes T dits de sélection négative.

Il a été montré que les CD immatures sont capables de phagocyter *C. albicans* via le mannose-fucose-récepteur et stimulent ensuite la prolifération des lymphocytes T (Newman & Holly, 2001, Romani, *et al.*, 2004). Les CD sont capables d'internaliser *C. albicans* à la fois sous forme blastopore ou hyphes. L'internalisation de la forme levure induit une réponse de type Th1 via la production IL-12 tandis que l'internalisation d'une forme mycélienne mènera à la production d'IL-4 (d'Ostiani, *et al.*, 2000). Cependant, elles sont moins efficaces que les macrophages (Netea, *et al.*, 2004).

### La phagocytose

La phagocytose est un processus actif par lequel les phagocytes reconnaissent des éléments solides/pathogènes du non soi puis ingèrent et dégradent par digestion intracellulaire (protéases, dérivés activés de l'oxygène et d'enzymes lysosomiales) ces éléments capturés dans le milieu extracellulaire.

La phagocytose de *C. albicans* s'effectue à la suite de son opsonisation par différents fragments du complément (C3b, Fc des IgG, Fc des IgE, etc...) et/ou les anticorps reconnus par les récepteurs spécifiques du macrophage. Un processus spécifique du pathogène indépendant des opsonines a été décrit mettant en jeu la reconnaissance des PAMPs ou « Pathogen-associated molecular patterns » par les PRRs pour « Pattern Recognition Receptors » présents sur les phagocytes. Les PAMPs sont des motifs moléculaires fortement conservés chez les microorganismes mais absents chez les mammifères (Lee, *et al.*, 2003). Il est maintenant admis que les PAMPs sont reconnus par les cellules du système immunitaire via des complexes multimoléculaires responsables de la fixation d'une part et de la signalisation d'autre part (Triantafilou & Triantafilou, 2005).

Plusieurs récepteurs exprimés par les phagocytes sont impliqués dans la reconnaissance des opsonines. Le CR3 et CR4 sont les récepteurs du C3bi (Ross, *et al.*, 1985, Lee, *et al.*, 1997, Calderone, 2002). Le CR1 reconnaît le fragment C3b. Ils sont présents chez les macrophages, les monocytes, les NK et les neutrophiles. Le fragment Fc des immunoglobulines G (IgG) est révéler par les récepteurs Fc (Cox & Greenberg, 2001) au nombre de 3 : Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) et Fc $\gamma$ RIII (CD16). De façon synergique, le phagocyte va reconnaître les complexes RFc-Ac-Ag formés. Ils contribuent à l'activation de la phagocytose, la production de molécules fongicides et promeuvent la production de cytokines et chimiokines (Calderone, 2002). Des études réalisées *in vivo* indiquent que le système du complément est important dans la résistance innée contre *Candida* (King, *et al.*, 2000).

Outre les mécanismes d'opsonisation, la phagocytose de *C. albicans* fait intervenir des PRRs spécifiquement dédiés à la reconnaissance de la levure. Il s'agit du CR3, du Mannose Récepteur, de la Dectine-1, de la Dectine-2 et du DC-SIGN présents sur les phagocytes.

Le CR3 est un récepteur impliqué dans la reconnaissance de polysaccharides fongiques tels que la N-acétylglucosamine, le zymosan, les  $\beta$ -glucanes et méthylglucoside (Thornton, *et al.*, 1996, Xia, *et al.*, 1999). Des études ont montré que le CR3 ne jouait pas un rôle essentiel dans la phagocytose du zymosan et de *C. albicans* (Heinsbroek, *et al.*, 2008). Il est possible qu'il interagisse avec d'autres récepteurs notamment la Dectine-1 durant la capture des particules fongiques, et lors de l'adhésion (Graham, *et al.*, 1989, Tang, *et al.*, 1997, Jongstra-Bilen, *et al.*, 2003, Rubin-Bejerano, *et al.*, 2007).

Le Mannose récepteur ou MR, exprimé aussi sur les CD non matures, reconnaît des carbohydrates riches en résidus mannose (Tarnowski, *et al.*, 1988, Shepherd, *et al.*, 1991, Sallusto, *et al.*, 1995, Vazquez-Torres & Balish, 1997, Takahashi, *et al.*, 1998, Linehan, *et al.*, 1999). Le MR participe à la phagocytose de *C. albicans* et à l'initiation de la production des cytokines par les macrophages (Karbassi, *et al.*, 1987, Marodi, *et al.*, 1991, Porcaro, *et al.*, 2003, Netea, *et al.*, 2006, Gow, *et al.*, 2007). Son rôle exact lors de la phagocytose du champignon est discuté (Le Cabec, *et al.*, 2005, Heinsbroek, *et al.*, 2008, Willment & Brown, 2008).

La dectine-1 (« DC-Associated C-type Lectin-1 ») est un récepteur lectinique de type C, exprimé sur les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les CD et les cellules de Langerhans (Brown & Gordon, 2001, Taylor, *et al.*, 2002). Elle reconnaît les  $\beta$ -glucanes de nombreux champignons : *C. albicans*, (Brown, *et al.*, 2003), *Aspergillus fumigatus* (Steele,

*et al.*, 2005), *Pneumocystis carinii* (Steele, *et al.*, 2003) et *Coccidioides posadasii* (Viriyakosol, *et al.*, 2005). L'expression de la Dectine-1 varie en fonction du type d'infection (Ozment-Skelton, *et al.*, 2009). C'est le principal récepteur impliqué dans la phagocytose de *C. albicans* (Gantner, *et al.*, 2005, Heinsbroek, *et al.*, 2008).

Contrairement au MR, le DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM (intracellular adhesion molecule)-grabbing non integrin) reconnaît des structures mannosidiques ramifiées. Exprimés par les CD et les macrophages, il intervient dans la fixation de parasites (*Leishmania*, *Mycobacteria*), de virus (VIH, Ebola, SIV) et de levures (*C. albicans*) (Geijtenbeek, *et al.*, 2000, Colmenares, *et al.*, 2002, Cambi, *et al.*, 2003).

La dectine-2 est distribuée sur les macrophages, cellules de Langerhans et les CD. Cette lectine de type C reconnaît une structure spécifique de 8 résidus mannose (McGreal, *et al.*, 2006). Son expression est augmentée lors de l'inflammation, notamment celle induite par *C. albicans* (Ariizumi, *et al.*, 2000, Taylor, *et al.*, 2005). Ce récepteur est le seul à interagir préférentiellement avec la forme mycélienne de *C. albicans*.

#### b. Inflammation induite par le complément, eicosanoides et cytokines

La réponse inflammatoire joue une fonction essentielle dans la lutte contre l'infection notamment par le recrutement de cellules effectrices au site d'infection, réparation des tissus lésés, etc.

L'inflammation au niveau du site d'infection est initiée par les macrophages en réponse à l'agent pathogène. Quatre signes caractérisent l'inflammation : une douleur (qui semble pulser), rougeur (érythème), gonflement (œdème), une sensation de chaleur. La phase vasculaire se définit par une vasodilatation, une augmentation de la perméabilité vasculaire, la libération de molécules préformées par les mastocytes (histamine et sérotonine), l'activation de protéines plasmatiques inactives (facteur XII, complément, etc), la sécrétion de médiateurs lipidiques (prostaglandines, PAF, etc). Elle est suivie de la phase cellulaire, déterminée par la margination leucocytaire, le « rolling » (interaction des leucocytes et des cellules endothéliales par l'intermédiaire de sélectines) et la diapédèse.

Les cellules endothéliales, qui délimitent les vaisseaux sanguins, activent l'expression de molécules d'adhésion qui préviennent la migration des leucocytes dans les tissus (Janeway, 2003, Delves P., 2006). Toutes ces modifications sont induites par différents médiateurs inflammatoires libérés lors de la reconnaissance du pathogène : Facteur activateur de

plaquettes (PAF), peptides du complément (C3a et C5a), eicosanoïdes (prostaglandines et leucotriènes), cytokines et chimiokines.

Le Facteur Activateur de Plaquette (PAF ou 1-*o*-alkyl-2-acetyl-*sn*-glyceryl-3-Phosphorylcholine) est produit par toute une gamme de cellules impliquées dans les réactions inflammatoires : neutrophiles, basophiles, éosinophiles, macrophages, plaquettes et cellules endothéliales (Chignard, *et al.*, 1979). Il est relâché en réponse aux cytokines pro-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$  et IL-1 et induit en retour la stimulation d'autres cytokines (Dubois, *et al.*, 1989). Outre son effet immunomodulateur, le PAF a pour résultat de provoquer une réaction inflammatoire aigüe par dégranulation histaminique des mastocytes et régule l'agrégation plaquettaire. Il participe à la protection de l'hôte contre les infections à *C. albicans*. En effet, des administrations de PAF à des souris augmentent leur résistance à la levure. Il est produit de façon endogène en réponse à *C. albicans*, induit l'activation précoce de NF- $\kappa$ B qui mène la sécrétion de TNF- $\alpha$  (Im, *et al.*, 1997, Choi, *et al.*, 2001, Nagi-Miura, *et al.*, 2007). De plus, l'interaction entre le PAF et le TNF- $\alpha$  est importante sur le développement de la maladie les 4 premiers jours post-infection (Kalkanci, *et al.*, 2002).

Enfin, il régule la production de NO via l'activation de NF- $\kappa$ B permettant d'inhiber la croissance du champignon et induit l'activation de la phospholipase A2 (Souza, *et al.*, 2007, Kim, *et al.*, 2008).

Les peptides C3a et C5a mènent à la dégranulation des mastocytes, à la contraction des cellules du muscle lisse et augmentent la perméabilité vasculaire. Le C5a agit comme un puissant attracteur pour les neutrophiles et monocytes (Janeway, 2003).

La déficience en C5 chez des souris conduit à une rapide prolifération de *C. albicans* dans les organes cibles, incapables de mobiliser les granulocytes et inaptes à développer une réponse inflammatoire protectrice (Mullick, *et al.*, 2004). Les techniques de microscopie de fluorescence et électronique ont pu mettre en évidence l'activité antifongique du C3a par induction de perturbations membranaires (Sonesson, *et al.*, 2007).

La prostaglandine E2 (PGE2) est un médiateur cellulaire impliquée dans la vasodilatation, l'inhibition de l'agrégation plaquettaire, la migration et la prolifération lymphocytaire. Elle favorise la contraction de l'utérus, inhibe la 5-lipo-oxygénase et diminue la synthèse de leucotriènes et est à l'origine de la fièvre (Narumiya, *et al.*, 1999, Janeway, 2003). La PEG2

induit des réactions pro-inflammatoires. Cependant, elle est aussi impliquée dans des effets antagonistes tels que l'inhibition de la sécrétion de cytokines (TNF- $\alpha$ ) ou chimiokines, l'inhibition de la réponse Th1 et la prolifération des lymphocytes (Kunkel, *et al.*, 1988, Standiford, *et al.*, 1992, Sergeeva, *et al.*, 1997, Vassiliou, *et al.*, 2003).

*C. albicans* conduit à la production de PGE2 dans les cellules endothéliales, épithéliales et dans de nombreuses cellules mononuclées du sang périphérique (Witkin, *et al.*, 1991, Filler, *et al.*, 1994, Deva, *et al.*, 2003). Des données expérimentales indiquent que le TLR2 est le principal récepteur contribuant à la production de PGE2 en réponse à *C. albicans* (Villamon, *et al.*, 2005). De plus, il a été décrit que la PGE2 stimule la formation de mycélium de *C. albicans* (Kalo-Klein & Witkin, 1990). Ceci permet d'expliquer en partie l'effet bénéfique de l'aspirine dans les candidoses vulvovaginale (Deva, *et al.*, 2001, Alem & Douglas, 2004). D'autre part, le champignon est capable de synthétiser des prostaglandines (Noverr, *et al.*, 2003, Alem & Douglas, 2005) notamment de la PGE2 à partir de l'acide arachidonique via une voie indépendante de Cox2 (Erb-Downward & Noverr, 2007).

La synthèse de ces eicosanoïdes par la levure représente un nouveau facteur de virulence.

Les cytokines sont des protéines synthétisées par de nombreux types cellulaires, particulièrement les macrophages et les lymphocytes T, en réponse à différents stimuli (pathogènes, toxines, etc.)

Ces cytokines se lient à des récepteurs spécifiques de cellules cibles. L'interaction ligand-récepteur induit une cascade de réactions à l'intérieur de la cellule cible, activant ou inhibant certaines de ses fonctions. Les cytokines sont impliquées dans l'élaboration de la réponse immunitaire innée via l'activation des macrophages et des lymphocytes NK et dans la réponse immunitaire spécifique par les lymphocytes T et B. Ce sont aussi des outils de connexions entre les deux types de réponse. Les cytokines tiennent une fonction essentielle dans la régulation de l'hématopoïèse.

Les principales cytokines sécrétées durant une infection à *C. albicans* sont les suivantes : TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-6, IL-10 et IL-4.

Le TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18 et IL-6 sont des cytokines pro-inflammatoires tandis que l'IL-10 et IL-4 sont des cytokines anti-inflammatoires. Elles sont sécrétées rapidement par les phagocytes suite à l'interaction avec *C. albicans* et orientent le devenir de l'infection.

Le TNF- $\alpha$  est essentiel dans le contrôle des candidoses systémiques. Cette cytokine régule le recrutement des cellules phagocytaires et induit l'expression de molécules co-stimulatrices. Elle stimule la phagocytose par les macrophages, la production d'IL-1, de PGE2 et autres. La neutralisation du TNF- $\alpha$  endogène par un anticorps spécifique ou via des drogues comme la chlorpromazine, favorise le développement de l'infection (Steinshamn & Waage, 1992, Netea, *et al.*, 1995). Des souris déficientes en TNF- $\alpha$  ou en ces récepteurs spécifiques sont plus susceptibles aux candidoses (Netea, *et al.*, 1995, Steinshamn, *et al.*, 1996, Mencacci, *et al.*, 1998). Des expériences récentes indiquent que les profils cytokiniques au cours de l'infection sont modulables et qu'il est nécessaire que la production de TNF- $\alpha$  et IFN $\gamma$  soient importantes dans les premiers instants de l'infection pour une élimination du champignon (Camargo, *et al.*, 2009).

L'IL-6 est sécrétée par les macrophages et lymphocytes T. Elle intervient dans de nombreux processus : la différenciation des lymphocytes B, la production d'anticorps, rôle de co-facteur lors de l'hématopoïèse. Elle est à l'origine de la fièvre. L'IL-6 s'est révélée être le principal facteur impliqué dans la génération des lymphocytes T cytotoxiques. L'IL-1 $\beta$  est produite par les macrophages mais aussi par les monocytes et les CD. Elle augmente l'expression de facteurs d'adhésion sur les endothéliales, afin de faciliter la transmigration des leucocytes au site d'infection. De plus, elle est impliquée dans la libération de cortisol et de la fièvre.

L'IL-6 et L'IL-1 $\beta$  participent à la réponse innée contre *C. albicans*. En effet, des souris KO IL-6 sont plus susceptibles à l'infection avec une charge en levures dans les organes cibles plus importante, et un manque de recrutement des neutrophiles au site d'infection (Kullberg, *et al.*, 1999, van Enkevort, *et al.*, 1999). D'autre part, l'administration d'IL-1 $\beta$  recombinante protège les souris contre les infections à *Candida*. Cependant, l'absence de sécrétion d'IL-1 n'augmente pas la susceptibilité à l'infection (Mencacci, *et al.*, 1998).

L'IL-18 est produite par un grand nombre de cellules dont les macrophages et les PBMC. C'est un membre de la superfamille de l'IL-1, ainsi qu'un régulateur important de la réponse immunitaire innée et acquise. L'IL-18 endogène est nécessaire pour la défense de l'hôte contre les candidoses. Ainsi, le traitement de souris avec de L'IL-18 recombinante réduit la mortalité et la présence de levures dans le rein, augmentant le taux d'IFN- $\gamma$  (Stuyt, *et al.*, 2002, Tardif, *et al.*, 2004)

L'IFN- $\gamma$  est principalement connue pour ces activités antivirales, antiparasitaires et anti tumorales. Elle est sécrétée par les lymphocytes Th1 activés, les NK, les NKT, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> et les lymphocytes T $\gamma\delta$ . Ses actions sont nombreuses : augmentation de l'expression du complexe d'histocompatibilité de classe II sur les cellules B et les macrophages, potentialisation de l'expression des récepteurs pour l'IL-2 sur les cellules Tc, favorise l'activité cytotoxique des NK, provoque la différenciation des cellules B et inhibe les cellules Th2 pour renforcer les réponses contrôlées par les cellules Th1. C'est la principale cytokine responsable de l'activité MAF (« macrophage arming factor »). Ce facteur augmente l'expression des récepteurs Fc $\gamma$ R sur les macrophages. L'expression d'IFN- $\gamma$  anormale est associée à des maladies autoimmunes et autoinflammatoires.

L'IFN- $\gamma$  a une fonction indispensable dans la défense contre *C. albicans*. En effet, des souris KO pour l'IFN- $\gamma$  sont plus susceptibles à une infection par la levure. De même, l'administration d'anticorps anti-IFN- $\gamma$  induit une réponse Th2 non protectrice (Romani, *et al.*, 1992, Kaposzta, *et al.*, 1998).

L'IL-12 est un hétérodimère de 70 kDa produite par les macrophages, les CD et les cellules B. Cette cytokine possède des fonctions régulatrices au niveau de l'initiation et de la régulation de la réponse immune cellulaire. Elle est capable de réguler la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellule Th1 (Romani, 2004). Elle stimule la production d'IFN $\gamma$  et TNF- $\alpha$  par les lymphocytes T et les NK. Elle contrôle ainsi la réponse immunitaire acquise à travers les lymphocytes T (Trinchieri, *et al.*, 2003).

*C. albicans* induit la sécrétion de cette cytokine par les monocytes/macrophages et les CD (Chiani, *et al.*, 2000, d'Ostiani, *et al.*, 2000, Liu, *et al.*, 2001). Des souris déficientes en IL-12 sont plus sensibles à *C. albicans* (Mencacci, *et al.*, 1998). De plus, le champignon est capable d'en inhiber la production dans le but de diminuer l'intensité de la réponse immunitaire (Tang, *et al.*, 2004).

L'IL-10 est une cytokine anti-inflammatoire sécrétée par les macrophages, les neutrophiles, les lymphocytes T et B et les kératinocytes. Elle est capable d'inhiber la synthèse d'IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, TNF- $\alpha$  et GM-CSF par les cellules telles que les macrophages et les cellules Th1. Elle peut aussi stimuler les thymocytes et les cellules B. Des souris déficientes en IL-10 développent spontanément des inflammations chroniques de l'intestin

dues à une production non contrôlée de cytokines par les macrophages et les cellules Th1 (Kuhn, *et al.*, 1993, Berg, *et al.*, 1996).

L'IL-10 est une cytokine immunorégulatrice produite lors de la phagocytose de *C. albicans* et constitue un facteur décisif dans l'évolution de l'infection (Mencacci, *et al.*, 1998, d'Ostiani, *et al.*, 2000, Tavares, *et al.*, 2000). Cette cytokine réduit la production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-12 et inhibe le développement d'une réponse cellulaire protectrice (Mencacci, *et al.*, 1998, Roilides, *et al.*, 2000). L'IL-10 est sécrétée en réponse à la forme mycélienne de *C. albicans* et pourrait donc contribuer à sa virulence (d'Ostiani, *et al.*, 2000, Bozza, *et al.*, 2004).

L'IL-4 est sécrétée par les cellules Th2. Elle a des fonctions importantes au sein de l'immunité humorale et adaptative dont l'activation, la croissance, l'induction du CMH de classe II pour les cellules B, l'inhibition des macrophages. La surproduction d'IL-4 est associée à l'allergie.

L'IL-4 est un facteur important dans le développement de candidoses systémiques (Mencacci, *et al.*, 1998). En effet, elle inhibe la phagocytose et participe à la mise en place d'une réponse immune Th2. Des études indiquent que les CD sécrètent de l'IL-4 suite à l'interaction avec la forme mycélienne de *C. albicans* mais pas face à la levure (d'Ostiani, *et al.*, 2000). Cependant, chez des patients atteints de candidoses mucocutanées, la susceptibilité à cette candidose n'est pas associée au taux d'IL-4 (Fidel, 2005). De même, une étude montre que la neutralisation de l'IL-4 ou de ces récepteurs, est associée à une augmentation de la résistance à *C. albicans* (Romani, *et al.*, 1992). Káposzta *et al* n'observent pas pour leur part, de différences de susceptibilité entre des souris KO IL-4 et les souris contrôles (Kaposzta, *et al.*, 1998).

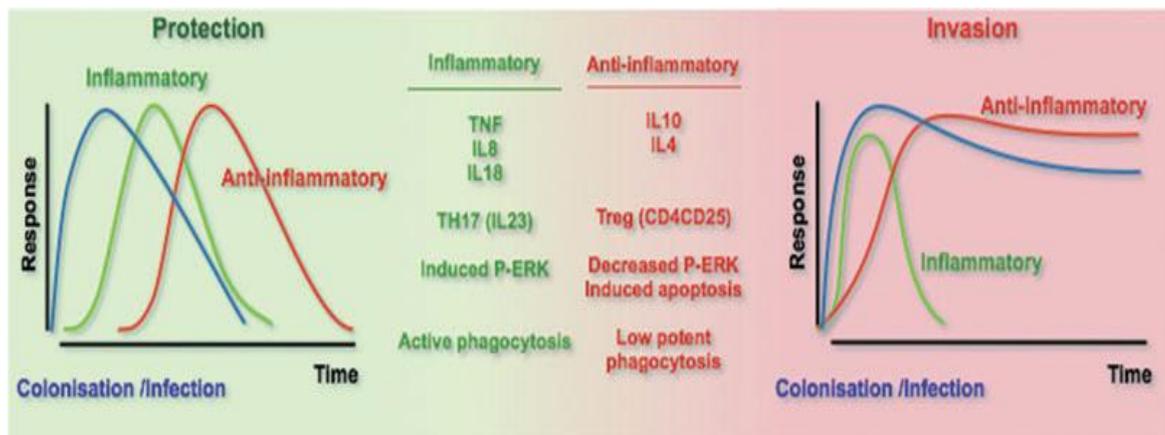


Fig 6 : Réponse immunitaire initiale induite par *C. albicans*. D'après Jouault *et al.*, 2009.

### c. Activation des NK

Les lymphocytes « natural killer » ou NK font partie des cellules de l'immunité innée. Ce sont des lymphocytes non T (CD3-) et non B (CD19-) et elles sont à différencier des NKT qui présentent des marqueurs de cellules T et de lymphocytes NK. Elles interviennent en première ligne dans la lutte contre divers micro-organismes, dans la surveillance des tumeurs et de leurs métastases. Elles constituent par ailleurs un maillon essentiel de la mise en alerte de l'immunité spécifique. Ce sont d'une part des effecteurs capables de lyser des cellules infectées, stressées ou transformées via leur activité cytotoxique. D'autre part, ce sont des modulateurs de la réponse immunitaire par la sécrétion de cytokines essentielles (INF $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , parfois IL-10 et IL-13) entrant dans la potentialisation de leur activité cytotoxique et intervenant dans la régulation des CD, des macrophages, des neutrophiles et des lymphocytes T (Janeway, 2003, Delves P., 2006). L'activation d'une cellule NK est la résultante d'effets opposés, inhibiteurs (motifs « ITIM » : immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif) et activateurs (séquences « ITAM » : immunoreceptor tyrosine-based activation motif) (Lanier, 2003, Bottino, *et al.*, 2005, Lanier, 2005, Lanier, 2008).

Des études ont montré que les cellules NK expriment des TLRs fonctionnels (TLR1-8) (Hornung, *et al.*, 2002). De plus, elles sont capables de répondre notamment via la régulation de la production d'INF $\gamma$  aux ligands des TLRs tels que la flagelline (TLR5) (Chalifour, *et al.*, 2004), le lipophosphoglycane de *Leishmania* (TLR2) (Becker, *et al.*, 2003), motifs CpG de l'ADN (TLR9) (Sivori, *et al.*, 2004).

La coopération entre les CD et les NK se révèle importante dans la régulation de la réponse immunitaire (Reschner, *et al.*, 2008). En effet, les CD sont activées principalement par le TNF- $\alpha$  et INF $\gamma$ , synthétisés par les cellules NK. De même que l'activation des NK est

médiée par les contacts cellulaires et les facteurs solubles produits par les CD (Ferlazzo, *et al.*, 2003, Raulet, 2004). Enfin, les CD immatures sont éliminées par les NK à travers des contacts cellulaires (Della Chiesa, *et al.*, 2005).

Les cellules NK ont un rôle majeur dans l'élaboration de la réponse immunitaire innée et la défense contre les infections virales et cellules malignes. Plusieurs études réalisées *in vitro* indiquent qu'elles participeraient à la lutte contre les infections bactériennes et fongiques. En effet, les lymphocytes NK activés secrètent du TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et du GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) conduisant à une potentialisation de l'activité fongicide des cellules phagocytaires (Ferrante, 1989, Marodi & Johnston, 1993, Arancia, *et al.*, 1998, Murciano, *et al.*, 2006). De plus, le pouvoir cytotoxique des NK est augmenté via IL-15 produite par les PBMC exposés à *C. albicans* (Tran, *et al.*, 2003).

Cependant, les travaux effectués *in vivo* apparaissent contradictoires et le statut tenu par les NK dans la défense contre *C. albicans* restent confus (Greenfield, *et al.*, 1993, Romani, *et al.*, 1993, Balish, *et al.*, 2001, Algarra, *et al.*, 2002, Gaforio, *et al.*, 2002).

## **B. Immunité spécifique**

L'immunité adaptative ou encore appelée acquise ou spécifique fait intervenir deux types de réponses : l'immunité à médiation cellulaire dont les acteurs clés sont les cellules T, B ainsi que les cellules présentatrices d'antigènes, et l'immunité humorale médiée par les anticorps sécrétés par les plasmocytes. Elle se caractérise par sa spécificité (un domaine particulier antigène reconnu par des lymphocytes spécifiques), sa diversité (réponse à un grand nombre de types de domaines antigéniques), sa fonction de mémoire (genèse de cellules mémoire de réserve), l'auto-limitation (lorsque l'antigène est neutralisé, la réponse cesse) et sa tolérance (élimination des lymphocytes exprimant des récepteurs spécifiques pour les antigènes du soi).

### 1- Immunité à médiation cellulaire

#### Lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T sont les principales cellules impliquées dans la réponse immunitaire spécifique et jouent un rôle central dans la défense contre les infections fongiques (Cantorna & Balish, 1990, Black, *et al.*, 1999).

Selon le stimulus, le site d'infection, le profil de cytokines produites, la réponse immunitaire peut prendre deux orientations : Th1 ou Th2. En ce qui concerne *C. albicans*, le profil cytokinique de type Th1 à dominante cellulaire dite pro-inflammatoire est caractérisé par la production d'IL-12, IFN $\gamma$ , TNF- $\alpha$  et/ou GM-CSF. Ce profil est associé à la résistance à l'infection. Il permet l'élimination de la levure par les phagocytes au niveau des tissus infectés (Huffnagle & Deepe, 2003).

Le profil cytokinique Th2 à médiation humorale dite anti-inflammatoire est déterminé par la production d'IL-4, IL-5, IL-13 et IL-10. Il est retrouvé au niveau des infections systémiques par le contrôle de la dissémination (Romani, 2004).

Les mécanismes de régulation sont complexes, ceci s'expliquant par le fait que certaines cytokines sont à fois secrétées par les Th1 et les Th2. C'est la balance entre les deux types de régulation qui contribue à l'équilibre commensal-pathogène.

La régulation de cette balance Th1/Th2 implique d'autres cellules dont les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> ou lymphocytes T régulateurs (Tregs). Une des fonctions des Tregs est de réguler négativement la réponse Th1 ou Th2 (Romani, *et al.*, 2002). Leur activité immunosuppressive s'exécute par la sécrétion de certaines cytokines (IL-10 et TGF- $\beta$  (« Transforming-Growth Factor-beta »)) et par la médiation des contacts entre les cellules (O'Garra & Vieira, 2004). Différents types de Tregs ont été définis et sont impliqués dans le contrôle de l'auto-immunité spécifique d'organe et de la tolérance à la transplantation.

Ces cellules ont été décrites dans la régulation des infections fongiques. En effet, les Tregs retrouvés chez des souris infectées par *C. albicans*, produisent de l'IL-10 et TGF- $\beta$ . Cette production permet l'élimination partielle du champignon du tractus gastro-intestinal dans le cadre de l'élaboration de l'immunité dite mémoire. D'autre part, l'absence de cytokine de type Th1 est associée avec un taux élevé d'IL-10 chez les patients atteints de candidoses mucocutanées chroniques (chronic mucocutaneous candidiasis) pouvant être la conséquence d'une dérégulation des Tregs (Romani & Puccetti, 2006). L'induction des Tregs CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> dans les candidoses nécessite la participation des TLRs, principalement du TLR2, et de la molécule B7 ainsi que la sécrétion d'IL-10 par les CD (Montagnoli, *et al.*, 2002, Netea, *et al.*, 2004, Suttmuller, *et al.*, 2006).

Des travaux récents ont permis de mettre en évidence une nouvelle population de lymphocytes T CD4+ distincte des Th1 et des Th2 : les Th17. Sous l'influence du TGF- $\beta$ , de l'IL-6, de l'IL-21 et de l'IL-23, le lymphocyte T CD4+ naïf se différencie en lymphocyte Th17. Actuellement, les lymphocytes Th17 sont reconnus comme les acteurs principaux de l'inflammation locale par l'intermédiaire des cytokines pro-inflammatoires (IL-17, -21 et -22) qu'ils sécrètent et par l'expansion et le recrutement des neutrophiles qu'ils entraînent. De ce fait, ils sont impliqués dans les processus inflammatoires chroniques, les maladies auto-immunes (polyarthrite rhumatoïde, lupus érythémateux disséminé), l'allergie et le rejet de greffes allogéniques. De plus, les cellules Th17 semblent avoir un rôle non négligeable dans les infections à *C. albicans* (Nakae, *et al.*, 2002, Matsuzaki & Umemura, 2007, Romani & Puccetti, 2007). Ainsi, des souris n'exprimant pas de récepteur à l'IL17 sont plus susceptibles à une candidose systémique (Huang, *et al.*, 2004). Des études réalisées *in vitro* sur des cellules T auxiliaires montrent que la levure induit la production d'IL-12 et IL-23 (réponse de type Th1) tandis que la forme mycélienne conduit seulement à la sécrétion IL-23 (réponse de type Th17) (Acosta-Rodriguez, *et al.*, 2007, LeibundGut-Landmann, *et al.*, 2007). La Dectine-2, PRR impliqué dans la reconnaissance des hyphes, serait à l'origine de la production d'IL-23 et de la voie Th17. La Dectine-1 et le Mannose receptor contribueraient à la production de l'IL-17 (Sato, *et al.*, 2006, Palm & Medzhitov, 2009, Robinson, *et al.*, 2009). D'autres travaux indiquent qu'IL-23 et la voie Th17 agissent comme des régulateurs négatifs de la réponse immune Th1 contre *C. albicans* (Zelante, *et al.*, 2007).

#### Cellules Dendritiques :

Les CD sont des cellules présentatrices d'antigène dites « professionnelles ». Ce sont les seules qui soient capables de stimuler les lymphocytes T pour initier la réponse immune adaptative aux antigènes qu'elles présentent. Elles sont équipées d'un certain nombre de PRRs impliqués dans la reconnaissance de *C. albicans* dont le mannose receptor, dectine-1, DC-SIGN mais aussi le récepteur Fc et les différents récepteurs des compléments. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les CD discriminent la levure de la forme mycélienne de *C. albicans* et sont capables de produire des cytokines pour induire une réponse Th adaptée (Romani, 2004). En effet, la blastoconidie est phagocytée via la reconnaissance des PRRs tandis que la forme mycélienne nécessite une opsonisation préalable (Bozza, *et al.*, 2004). De plus, l'ingestion de la levure opsonisée induit la production de cytokines de type Th2 alors que la phagocytose via le MR conduit à une

réponse de type Th1 (Montagnoli, *et al.*, 2002). Des travaux montrent que la phagocytose de la levure mène à la production d'IL-12 et celle de la forme mycélienne entraîne l'inhibition de celle-ci et la sécrétion d'IL-4 (d'Ostiani, *et al.*, 2000, Bacci, *et al.*, 2002, Torosantucci, *et al.*, 2004). De nombreuses études signalent que les CD pourraient être utilisées en thérapie alternative contre les infections à *C. albicans* (Bacci, *et al.*, 2002, Bozza, *et al.*, 2004).

### Lymphocytes T CD8+

Les cellules T CD8+ (ou CTL) fonctionnent comme des cellules tueuses ou cytotoxiques dont le but est d'éliminer les cellules infectées par des agents infectieux intracellulaires. Elles participent à la lutte contre les infections fongiques mais les processus mis en jeu sont encore mal connus. Des études indiquent que les CTL ont un effet antifongique contre les hyphes de *C. albicans* (Deepe, 1997). Il a été observé un nombre persistant de CTL au cours d'infections vaginales (Ghaleb, *et al.*, 2003) et l'élimination de ces lymphocytes conduit à l'augmentation des dommages tissulaires durant une candidose systémique (Ashman, *et al.*, 1999). Cette fonction serait médiée par la production d'IFN- $\gamma$ . En effet, des souris KO pour MyD88 présentent des CTL ayant une production d'IFN- $\gamma$  plus élevée (Villamon, *et al.*, 2004).

### 2- Lymphocytes B : anticorps

Les lymphocytes B sont le support de l'immunité humorale adaptative reposant sur la production d'anticorps spécifiquement dirigés contre un antigène. Cette immunité humorale adaptative est responsable des réactions d'hypersensibilité de type I (anaphylaxie), II (cytotoxicité) et III (complexes immuns). Il a été démontré que la protection contre les infections fongiques disséminées résulte essentiellement de l'immunité humorale (Casadevall, *et al.*, 1998, Romani, *et al.*, 2004). Les anticorps dirigés contre des antigènes spécifiques de *C. albicans* sont peu décrits et leurs fonctions dans la résistance aux candidoses sont contestées. Certains anticorps semblent cependant être immunoprotecteurs (Casadevall, *et al.*, 1998, Bromuro, *et al.*, 2002, Fernandez-Arenas, *et al.*, 2004). En effet, ils pourraient exercer leurs actions par différents mécanismes tels que l'opsonisation, l'inhibition de l'adhésion, l'inhibition de la transition levure-mycélium, la neutralisation des facteurs de virulence (Montagnoli, *et al.*, 2003, Gozalbo, *et al.*, 2004, Sevilla, *et al.*, 2006, Torosantucci, *et al.*, 2009).

Pitard *et al* (2001) ont montré que les profils d'expression des anticorps en fonction du stade d'infection à *C. albicans* étaient variables. De plus, des profils distincts sont obtenus avec le sérum de souris vaccinées ou pas (Fernandez-Arenas, *et al.*, 2004).

Le sérum de patients atteints de candidoses systémiques contient un anticorps dirigé contre un antigène 47 kDa, identifié comme un fragment thermostable de protéine HSP90. Des souris immunisées avec un anticorps, développé à partir de ce fragment, présentent une mortalité moins importante à une candidose systémique (Matthews, *et al.*, 1991, Matthews & Burnie, 1992, Matthews & Burnie, 1992).

Des résultats satisfaisants ont été obtenus à partir d'un anticorps recombinant humain (mycograb) (Matthews, *et al.*, 1995, Matthews & Burnie, 2001). En effet, dans des modèles murins, mycograb a une action sur plusieurs espèces de levures et lorsqu'il est combiné à de l'amphotéricine B, il induit une guérison complète de l'infection. Récemment, des essais ont indiqué que l'association de cet anticorps avec de la caspofongine avait un effet synergique (Hodgetts, *et al.*, 2008). Chez l'homme, des essais ont montré une amélioration de l'état clinique de patients atteints de candidose systémique (Matthews, *et al.*, 2003, Pahl, *et al.*, 2006).

Des anticorps monoclonaux (IgM et IgG) dirigés contre les  $\beta$ -1,2 mannosés joueraient un rôle protecteur contre les candidoses chez la souris. La spécificité de ces anticorps ainsi que le système complément seraient impliqués (Han, *et al.*, 2000, Han, *et al.*, 2001).

Au cours de candidoses systémiques et vaginales, il a été détecté la présence d'anticorps anti-Sap, protéines impliquées dans la virulence du champignon (Naglik, *et al.*, 2003). L'immunisation par Sap2 ou l'administration d'un anticorps monoclonal anti-Sap2 protège partiellement de l'infection (De Bernardis, *et al.*, 1997, Vilanova, *et al.*, 2004).

L'équipe de Torosantucci a mis au point un vaccin capable d'immuniser et de protéger efficacement les souris contre les infections systémiques et vaginales à *C. albicans*. Il est basé sur les propriétés antifongiques des anticorps anti- $\beta$ -glucanes. Il s'agit de  $\beta$ -glucanes solubles issus de l'algue *laminaria digitata* couplée à l'anatoxine diphtérique CRM197, utilisée dans de nombreux vaccins. Le conjugué se fixe *in vitro* sur les mycéliums et inhibe leur croissance. De plus, les souris vaccinées avec ce conjugué sont protégées des infections à *Aspergillus fumigatus* (Torosantucci, *et al.*, 2005).

## V. Cellules macrophagiques et pathogènes

Les macrophages sont des cellules sentinelles dont l'un des rôles est de phagocyter et de détruire le pathogène via le relargage de substances microbicides. Ils modulent aussi la réponse immunitaire par initiation de la présentation antigénique et via la sécrétion de médiateurs (cytokines, chimiokines, prostaglandines).

Les macrophages jouent un rôle crucial dans la lutte contre les infections à *C. albicans* (Calderone, 2002).

### A. Rôle dans l'immunité naturelle

Les monocytes et les macrophages participent à l'immunité innée en tant que défense non-spécifique. En effet, ces cellules sentinelles sont aussi des cellules phagocytaires professionnelles. Elles sont capables de discriminer des éléments du « soi » et du « non-soi » via tout un panel de récepteurs.

Les opsonines (C3b, Fc des IgG, etc.) se fixent sur le pathogène et favorisent la liaison des récepteurs macrophagiques (CR3, CR4, FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16)) au pathogène. Les PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), motifs conservés présents à la surface du pathogène font intervenir des récepteurs spécifiques : les PRRs (Pattern Recognition Receptors) exprimés constitutivement par les phagocytes (MR, Dectine-1, etc.).

Suite à la détection d'un agent pathogène ou autre, les éléments étrangers sont phagocytés. La phagocytose est un processus dynamique au cours duquel les pathogènes sont internalisés dans un phagosome puis dégradés par digestion intracellulaire (protéases, dérivés activés de l'oxygène et enzymes lysosomiales). La libération du contenu des lysosomes, enzymes, lysozymes, peptides anti-microbiens va permettre la destruction intracellulaire. Parallèlement la production de dérivés toxiques de l'azote (NO) et de l'oxygène (anion superoxyde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) va participer à cette destruction.

Les macrophages, lorsqu'ils sont activés, sécrètent une multitude de médiateurs chimiques dans le milieu extracellulaire. Ces facteurs sont des cytokines (TNF-α, IL-6, etc.), des protéines enzymatiques (défensines, lysozyme, etc.), des espèces réactives de l'oxygène et du monoxyde d'azote. Les cytokines, les chimiokines et les médiateurs lipidiques dérivés de l'acide arachidonique (leucotriènes, prostaglandines) jouent un rôle important dans la

modulation et l'orientation de la réponse immune. Ils contribuent au recrutement ou non d'autres cellules effectrices au site d'infection tel qu'IL-8 pour les neutrophiles, à l'activation, stimulation des cellules comme l'IL-12 pour les NK. Ainsi, les macrophages sont décisifs dans l'orientation du devenir de l'infection.

### **B. Rôle dans l'immunité spécifique**

La stimulation lymphocytaire par les macrophages est moindre par rapport à celle induite par les CD mais non négligeable.

Suite à la digestion d'un pathogène, le macrophage se comporte en cellule présentatrice d'antigènes (CPA). Ils expriment à leur surface des molécules du CMH II et des molécules co-stimulatrices (B7). Via ces molécules, les macrophages sont capables de présenter un antigène dérivé du pathogène digéré aux lymphocytes T CD4+. Il existe une relation de symbiose avec les lymphocytes.

Dépendants du type de récepteur engagé durant ces événements précoces, les macrophages sécrètent des cytokines telles que l'IL-12 ou de l'IL-10. En effet, IL-12 favorise l'élaboration d'une réponse de type Th1, en inhibant le développement de la réponse lymphocytaire, notamment par la production d'IFN $\gamma$ . Alors qu'IL-10 est un puissant facteur de prolifération et de différenciation des lymphocytes B, inhibant la réponse de type Th1 au profit de la mise en place d'une réponse de type Th2.

Ainsi, les macrophages orientent par ces interactions spécifiques et par la production de cytokine qui en résulte, l'activation des lymphocytes soit vers une réponse de type Th1 dite cellulaire ou soit vers une réponse de type Th2 dite humorale (Fig 7).

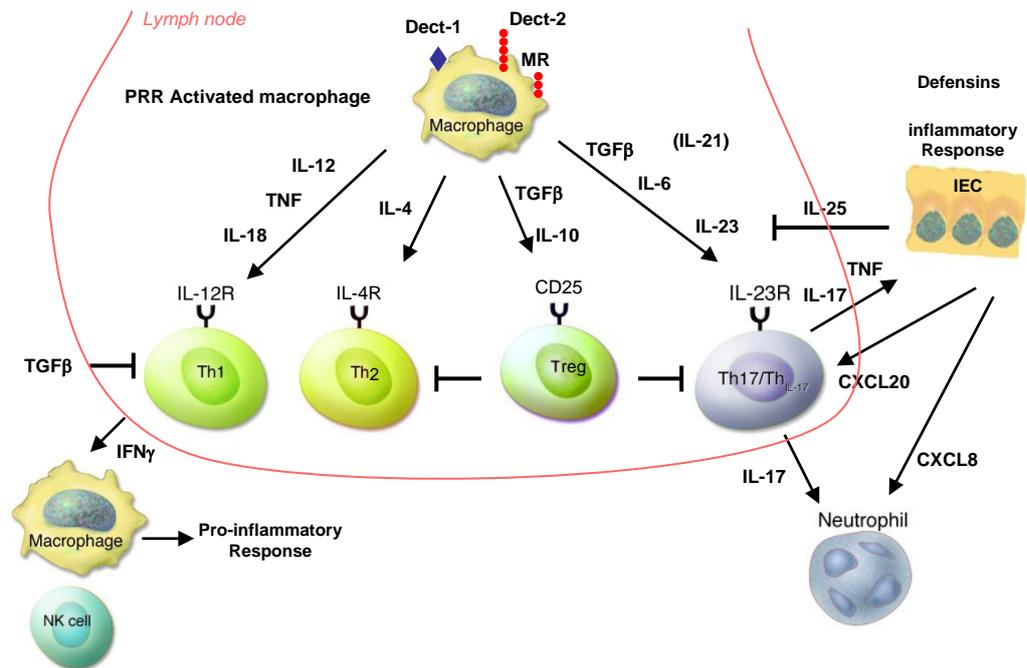


Fig 7 : Rôle des macrophages dans le développement de la réponse immune.

### C. Signalisation

#### 1- Protéines Tyrosine Kinases (PTKs)

Les Protéines Tyrosine Kinases (PTKs) sont formées d'un domaine catalytique : SH2 (Src Homology Region) se fixant à des séquences caractéristiques contenant un résidu tyrosine phosphorylé et un domaine SH3 interagissant avec des séquences riches en proline. Ces enzymes catalysent le transfert d'un groupe phosphate de l'ATP à un ou plusieurs résidus tyrosine.

Il existe deux catégories de protéines tyrosine kinases (PTKs) :

- Les récepteurs à activité tyrosine kinase : ce sont des protéines transmembranaires possédant un domaine extracellulaire qui fixe les ligands protéiques et un domaine intracellulaire catalytique qui phosphoryle les substrats protéiques adéquats.
- Les enzymes cytoplasmiques ou associées à la membrane : ces protéines sont activées de façon indirecte par des signaux extracellulaires.

La phosphorylation réversible des résidus tyrosine des protéines, induite par les PTKs, mène à toute gamme d'évènements cellulaires : transduction intracellulaire des signaux, cascade de signalisation mais aussi à la différenciation, la croissance, l'apoptose (Fig 8).

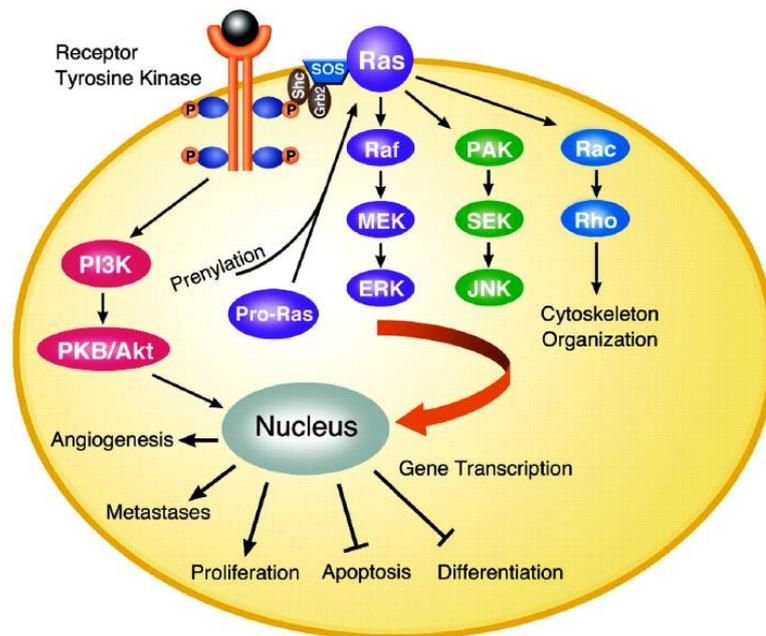


Figure 8 : Voies de signalisation activées par les PTKs. D'après Beeram *et al.*, 2005.

Un des exemples connu est l'activation des phospholipases C (PLC) conduisant au clivage phosphatidyl inositol 4,5 phosphate (PIP2) en inositol triphosphate (IP3) et diacylglycerol (DAG), impliqués dans la mobilisation du calcium intracellulaire et l'activation de protéines kinases C (PKCs).

Les récepteurs tyrosines kinases sont aussi impliqués dans les échanges GDP/GTP et dans l'activation de la voie des Mapk. En effet, les protéines Ras insérées dans la bicouche lipidique, se présentent sous formes inactives associées au GDP ou actives combinées au GTP. Elles jouent un rôle important dans la transduction des signaux provenant des récepteurs tyrosine kinase. Pour passer d'une forme inactive à active, la protéine Sos liée à la protéine Grb2 fait le lien avec les PTKs. Ceci provoque un changement de conformation de la protéine, la rendant capable de déclencher la voie des MAP kinases (Protéine kinase Activée par des Mitogènes).

## 2- Les Mapks

Les MAP kinases (Protéine kinase Activée par des Mitogènes) sont des protéines sérine/thréonine kinases répondant à des stimuli extérieurs et régulant de nombreuses activités cellulaires. La voie des MAP kinases (MAPK) constitue l'une des voies de signalisation les plus importantes au niveau cellulaire. Elle est impliquée dans la prolifération, la différenciation, l'apoptose, la production de cytokines, etc.

Les MAP kinases sont activées par un éventail de stimuli tels que les hormones ou facteurs de croissance. Les voies de transduction les impliquant reposent sur une cascade d'activation de MAPK kinase kinase (MAP3K) par des MAPKK comme MEK (MAP extracellular regulated kinase-(ERK) kinase). Ces MAPKs possèdent toutes un motif Thr-XXX-Tyr sur lequel s'effectue la phosphorylation par les MEKs elles-mêmes activées par les MAP3Ks par phosphorylation de leur domaine sérine-thréonine. Trois voies principales ont été décrites : ERK1/2 (Extracellular signal regulated), SAPK/JNK et p38.

La voie ERK1/2 (Extracellular signal regulated) est activée par des facteurs de croissance, des stimuli mitogènes. Elle régule la croissance et la différenciation cellulaire. De plus, elle est impliquée dans la réponse des cellules hôtes contre les pathogènes ou stimuli microbiens. Ras entre en interaction avec Raf qui phosphoryle à son tour les MAP kinase kinases, MEK1/2. Cette cascade de phosphorylation se poursuit par l'activation de ERK1/2 sur leurs résidus tyrosine et thréonine, qui à leur tour participent à la phosphorylation de protéines cibles dont p90RSK. Cette protéine peut alors phosphoryler l'histone 3 permettant la régulation de facteurs de transcription et participe à de nombreuses fonctions cellulaires telles que l'apoptose.

La voie SAPK/JNK et p38 sont déclenchées suite au stress ou par les cytokines. Toutes deux sont impliquées dans la différenciation cellulaire et l'apoptose. Elles sont régulées par des MAPKKs spécifiques, SAPK/ERK kinase (SEK) appelée aussi MKK4 ou JNK kinase (JNKK) qui active JNK, MKK3 et MKK6 activant p38.

### 3- Récepteurs membranaires et signalisation

#### a. TLRs

Les macrophages sont équipés de nombreux récepteurs afin de discriminer les différents pathogènes dont les TLRs pour « Toll like Récepteur ». Actuellement, 13 TLRs ont été décrits chez la souris et 10 chez l'homme. Il s'agit d'une famille de protéines très conservées se caractérisant par un domaine extracellulaire riche en leucine (« Leucine Rich Repeat domain ; LRR »), responsable de la reconnaissance des ligands (Bell, *et al.*, 2003) et d'une région intra-cytoplasmique dénommée TIR (« Toll/Interleukin-1 Receptor), capable de transmettre les signaux de transduction (Takeda & Akira, 2004). Ils reconnaissent les PAMPs présents sur les pathogènes ce qui conduit à la transduction de signaux menant à l'induction de gènes tels que les cytokines, molécules co-stimulatrices et bien d'autres. Chaque TLR recrute une combinaison spécifique d'adaptateurs comme MyD88, TIRAP,

TRIF et TRAM afin d'activer différents facteurs de transcription, obtenant ainsi une réponse appropriée et efficace contre les divers pathogènes. Ils ont un rôle majeur dans l'élaboration de la réponse immunitaire innée. Il a été décrit deux types de signalisation induits par les TLRs : une voie de signalisation dépendante de MyD88 et une voie indépendante de MyD88 (Kawai & Akira, 2007, Kawai & Akira, 2007) (Fig 9).

#### 1. Voie dépendante de Myd88

MyD88 contient à son extrémité terminale un domaine de 90 AA appelé « Death domain » (DD) et à son extrémité C-terminale un domaine TIR similaire à celui présent sur les TLRs. A travers ces deux domaines (TIR et DD), MyD88 agit comme une molécule adaptatrice entre les membres des TLRs et autres protéines impliquées dans la transduction du signal tels que IRAK (« IL-1 Receptor-Associated Kinase ») (Janssens & Beyaert, 2002) (Fig 9).

Lorsque le ligand se lie spécifiquement à son TLR, le domaine TIR de MyD88 interagit avec le domaine TIR des TLRs. MyD88 recrute et interagit à travers son domaine DD avec les différents membres de la famille IRAK dont IRAK-4, IAK-1 et IRAK-M. IRAK-4 est essentiel pour l'activation de la voie de transduction MyD88 dépendante.

Quand les protéines IRAK sont phosphorylées, elles se dissocient de MyD88 pour interagir avec TRAF6 (« TNF-Receptor-Associated Factor 6). TRAF6 forme alors un complexe avec ubcl3 et Uev1A qui induit l'activation de TAK1 (« Transforming growth factor- $\beta$ -Activated Kinase 1 »). TAK1 se complexe avec TAB1, TAB2 et TAB3 (« TAK1 Binding Proteins ») et active deux voies de signalisation distinctes impliquant les IKK (« IkappaB Kinases ») et les MAPK. Le complexe IKK induit la phosphorylation d'I $\kappa$ B, qui mène à la translocation dans le noyau de NF- $\kappa$ B. NF- $\kappa$ B contrôle l'expression de nombreux gènes comme ceux des cytokines, prolifération, etc.

De plus, les membres de la famille MAPK phosphorylés peuvent activer d'autres protéines telles que le facteur de transcription AP-1 (« Activator Protein 1 »), régulant l'expression de gènes impliqués dans l'apoptose et la production de cytokines.

## 2. Voie indépendante de MyD88

Des travaux sur des macrophages KO pour MyD88 ont mis en évidence l'existence d'une voie de signalisation indépendante de MyD88 (Kawai, *et al.*, 1999, Kawai & Akira, 2007). Cette voie de signalisation est impliquée dans la réponse contre les virus et induit la production d'IFN- $\beta$  via les TLR3 et 4.

La molécule TRIF (« TIR-Domain-Containing Adaptor Inducing-IFN- $\beta$  ») possédant un domaine TIR a été décrite comme une molécule adaptatrice pour les TLR3 et 4. Elle active IRF3 (« Interferon Regulatory Factor 3 ») et NF- $\kappa$ B. Une autre molécule possédant un domaine TIR, TRAM (« TRIF Related Adaptor Molecule ») participe à cette voie indépendante de MyD88 via le TLR4 (Takeda & Akira, 2004).

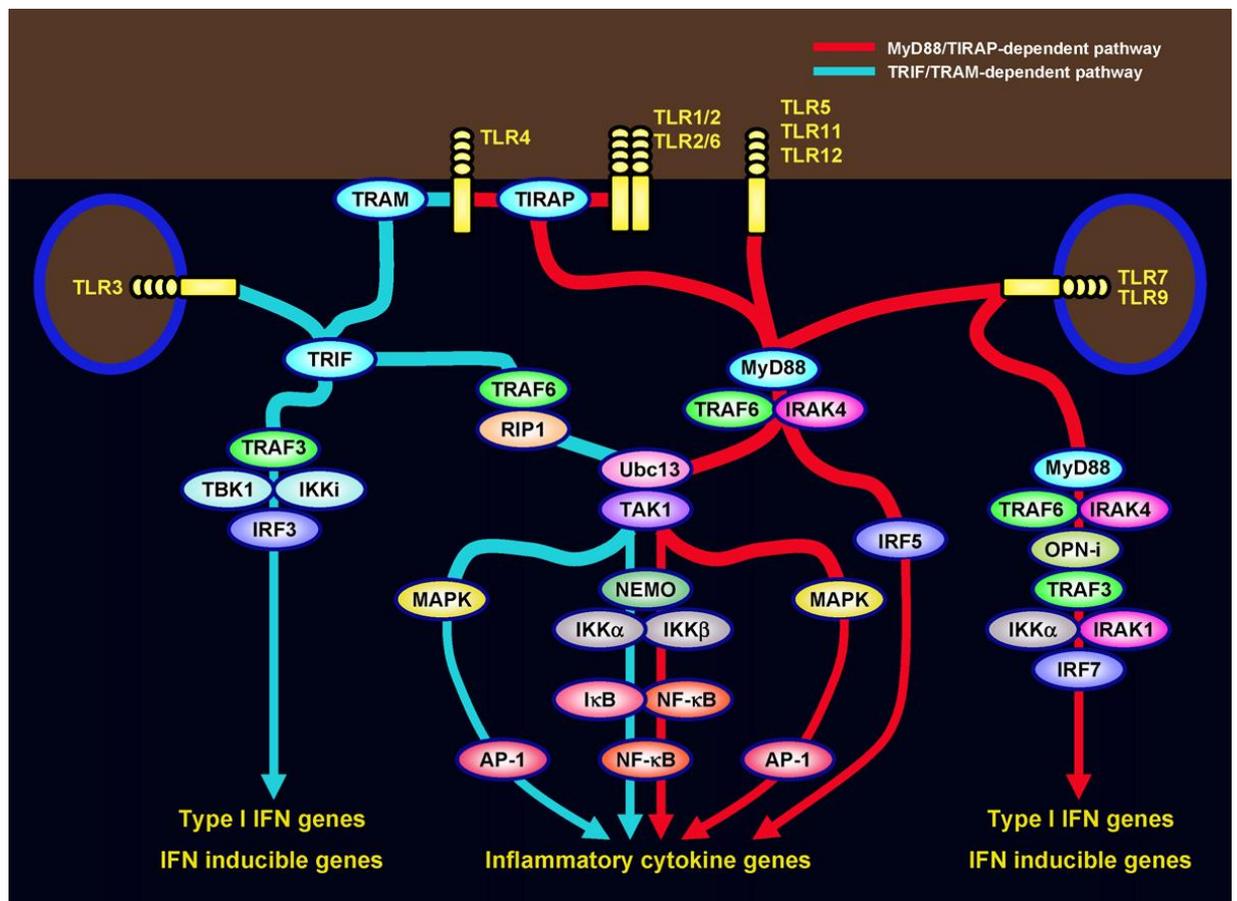


Figure 9 : Voies de signalisation induites par les TLRs. D'après Kawai et Akira, 2007.

## b. Dectine-1

Récemment, il a été décrit de nouvelles voies de signalisation intracellulaire, activée par le récepteur membranaire aux  $\beta$ -glucanes : la Dectine-1 (Fig 10).

En effet, la phosphorylation de la Dectine-1, suite à la liaison de son ligand, mène au recrutement de Syk (« Spleen Tyrosine Kinase »). L'interaction de Syk aux motifs ITAM de la Dectine-1 permet son activation par un changement de conformation indépendamment de MyD88. Cette tyrosine kinase, à son tour, phosphoryle CARD9 (« Caspase Recruitment Domain protein 9 ») qui interagit avec NF- $\kappa$ B (Gross, *et al.*, 2006, Hara, *et al.*, 2007). Ces signaux de transduction, induisent la production de cytokines comme l'IL-10 et l'IL-2 et de respiratory burst (Brown, 2006).

Syk joue un rôle pivot dans ces nouvelles voies de signalisation en participant aussi à l'activation de la voie TLR/MyD88 (Rogers, *et al.*, 2005, Gross, *et al.*, 2006, Hsu, *et al.*, 2007)

D'autre part, la Dectine-1 contribue à l'induction de la voie NF- $\kappa$ B non-canonique et peut activer NFAT (Gringhuis, *et al.*, 2009). Elle est aussi capable de conduire des signaux intracellulaires, indépendamment de Syk, tel que le processus de phagocytose par les macrophages (Brown, 2006) et d'activer la sérine-thréonine kinase Raf-1 (Gringhuis, *et al.*, 2009).

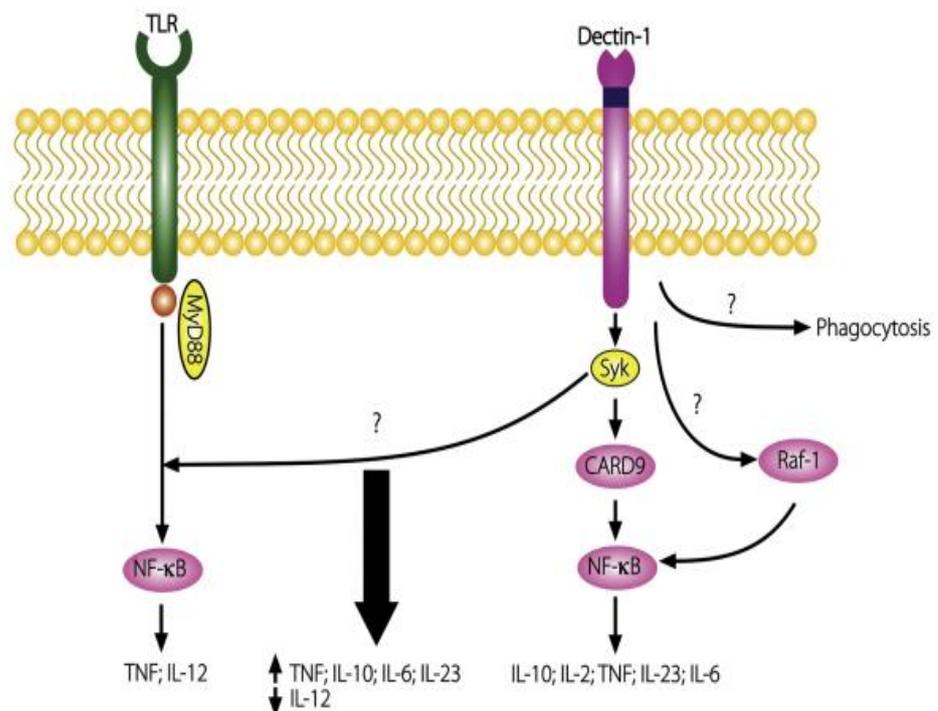


Figure 10 : Voies de signalisation activées par la Dectine-1. D'après Reid *et al.*, 2009.

### c. Mécanismes d'échappement des pathogènes aux fonctions macrophagiques

Les agents infectieux ont développé toute une panoplie de stratégies pour déjouer les mécanismes de défense immunitaire. Ils sont capables de résister aux mécanismes de la défense immune et provoquent ainsi des maladies plus sévères ou plus durables que la moyenne. Le plus souvent, il s'agit d'agents pathogènes intracellulaires comme VIH, *Listeria*, *Toxoplasma*, *Mycobacteria*, *Cryptococcus* mais aussi des microorganismes extracellulaires tels que les bactéries Gram- et les levures.

La plupart permettent au microorganisme/parasite de continuer l'invasion et la multiplication (d'où des infections persistantes et chroniques). Pour d'autres, la stimulation excessive et inefficace de l'immunité mène à des complications immunopathologiques, infections et parasitoses (dépôt de complexes immuns, suppurations chroniques..).

Les mécanismes d'échappement sont très divers et font l'objet de nombreux travaux. En effet, certains adoptent des stratégies d'échappement de la cellule phagocytaire via sécrétion de toxines (listeriolysin O, phospholipase de type C, fonctions T3SS) qui désorganisent la membrane du phagosome, ou s'équipent d'un « cell coat » polysaccharidique ou lipidique limitant les atteintes du parasite et la désactivation de la cellule macrophagique (*Shigella flexneri*, *Listeria monocytogenes*, *Rickettsia rickettsii*, *Burkholderia pseudomallei*, *Leishmania*) (High, *et al.*, 1992, Smith, *et al.*, 1995, Gedde, *et al.*, 2000, Whitworth, *et al.*, 2005, Pilatz, *et al.*, 2006, Naderer & McConville, 2008, Ray, *et al.*, 2009).

D'autres utilisent des mécanismes de détournement. Ils pénètrent par une autre voie spécifique du pathogène (*Salmonella typhimurium*, *Legionella pneumophila*, *Chlamydia trachomatis*). Certains inhibent la fusion du phagosome avec un lysosome (*S. typhimurium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. leprae*) ou empêchent l'acidification du phagolysosome (*Mycobacterium spp*) (Frehel & Rastogi, 1987, Koehler, *et al.*, 1997, Roth, 2004, Pieters, 2008).

*C. albicans* a développé des stratégies pour déjouer les défenses de l'hôte notamment vis à vis des macrophages. Les processus exacts mis en jeu sont plus ou moins connus. Il utilise principalement des stratégies d'échappement et de destruction de la cellule phagocytaire. *C. albicans* est une levure dimorphique qui peut adopter une forme de conidie ou une forme mycélienne en fonction de son environnement. A l'intérieur des phagolysosomes, il est capable de germer (d'une forme blastoconidie à un filament) ce qui lui permet de détruire le macrophage (Kaposzta, *et al.*, 1999). Le switching de *C. albicans* à l'intérieur du macrophage est dépendant de l'arginine (Ghosh, *et al.*, 2009).

L'efficacité de la fusion lysosomale conduit à la destruction de *C. albicans*. Il semble que la maturation du phagosome semble perturbée à un stade précoce via la protéine CD71. La levure inhibe la fusion phagosome-lysosome pour se transformer en hyphe (Kaposzta, *et al.*, 1999, Marcil, *et al.*, 2008, Fernandez-Arenas, *et al.*, 2009).

De plus, *C. albicans* freine sa capture via le camouflage de glycanes de sa paroi. La reconnaissance des  $\beta$ -glucanes est réalisée par la Dectine-1 exprimée par les macrophages. La dectine-1 ne peut se lier à la forme mycélienne de *C. albicans* car les  $\beta$ -glucanes ne lui sont pas accessibles (Heinsbroek, *et al.*, 2005).

Des travaux indiquent que le champignon dérégule le macrophage pour favoriser son « immuno-évasion ». Il module la sécrétion de cytokine de la cellule phagocytaire et donc l'orientation de la réponse inflammatoire et sa survie. En effet, *Candida* sous forme blastoconidie et filament stimule la production de cytokine par le TLR2 mais seule la forme blastoconidie est capable de stimuler la cellule via le TLR4. La perte des signaux induite par le TLR4 durant la germination conduit à une altération de la réponse cytokinique (van der Graaf, *et al.*, 2005).

De plus, des études menées au laboratoire ont montré que *C. albicans* dérégule la voie ERK1/2 via l'activation de la phosphatase MKP-1 afin de résister à la lyse par le macrophage. De même, le phospholipomannane présent dans la paroi et relargué, initie l'apoptose des macrophages en diminuant la phosphorylation de la protéine pro-apoptotique Bad (Ibata-Ombetta, *et al.*, 2003, Ibata-Ombetta, *et al.*, 2003).

*C. albicans* a mis au point une forme de mimétisme moléculaire dans le but d'échapper au système du complément. En effet, il a été mis en évidence à la surface de la levure deux récepteurs : *CR3-like* capable de fixer le C3bi (Gilmore, *et al.*, 1988) et *CR2-like* fixant le C3d (Calderone, *et al.*, 1988). Des résultats indiquent le rôle important des super oxydes dismutases (SOD) de *C. albicans* dans la neutralisation des dérivés oxygénés déployés par le macrophage. Des mutants *sod5D/D* et *sod4D/D* de *C. albicans* sont moins résistants à la lyse par les macrophages. Ainsi, Sod5 et Sod4 catalysent la destruction des dérivés oxygénés mis en place par l'hôte (Frohner, *et al.*, 2009).

## **VI. Interaction *C. albicans* / Macrophages**

### **A. Molécules fongiques impliquées dans l'interaction *C. albicans*/ macrophages**

#### 1- Le mannane ou phosphopeptidomannane

L'activité stimulatrice du mannane a fait l'objet de nombreux travaux. En effet, il constitue la couche externe de la paroi qui est directement en contact avec les cellules de l'hôte. Il est reconnu par les macrophages via le TLR4 et CD14 (Tada, *et al.*, 2002). Cette reconnaissance stimule la sécrétion de cytokines notamment le TNF- $\alpha$ .

Les O-glycosyls et les N-glycosyls seraient impliqués dans des réponses cytokiniques plus ou moins importantes et spécifiques. Ainsi, des mutants déficients en N- ou O-glycosyls sont moins capables d'induire des cytokines (Netea, *et al.*, 2006).

De plus, le mannane de *C. albicans*, contrairement au zymosan et  $\beta$ -glucanes, induit la production d'IL17. Cette réponse est dépendante des antigènes présents à la surface de la levure et du MR, démontrant que le mannane n'est pas un simple stimulus mitogène (van de Veerdonk, *et al.*, 2009, Rizzetto, *et al.*). De même, il serait impliqué dans l'inhibition de ROS, une des stratégies mise en place par la levure pour diminuer les dommages occasionnés par les macrophages (Ashman & Papadimitriou, 1995, Wellington, *et al.*, 2009).

Enfin, de nombreux travaux indiquent que le mannane est directement impliqué dans l'infection par *C. albicans* (Kanbe, *et al.*, 1993, Kanbe & Cutler, 1994, Munro, *et al.*, 2005, Bates, *et al.*, 2006, Geraldino, *et al.*, 2010). Une étude révèle que le mannane inhibe la capture de *C. albicans* de façon dose dépendant tandis que les glucanes n'ont pas d'effets (Marodi & Johnston, 1993).

#### 2- Le PLM

Le PLM (PhosphoLipoMannane) de *C. albicans* (Trinel, *et al.*, 1993, Trinel, *et al.*, 1999) est présent au sein du mannane et excrété par la levure après contact avec les cellules. Il est détecté par les macrophages via la Galectine-3 et le TLR2 (Fradin, *et al.*, 2000, Jouault, *et al.*, 2003, Jouault, *et al.*, 2006, Kohatsu, *et al.*, 2006). Le PLM est impliqué dans la réponse macrophagique en induisant la production de TNF- $\alpha$  (Jouault, *et al.*, 1994, Jouault, *et al.*, 1998). D'ailleurs, le glycolipide permet l'échappement de la levure lors de la phagocytose. En effet, le PLM dérégule les signaux de transduction notamment via

l'inhibition de la phosphorylation d'ERK menant à une altération des processus de destruction de la levure. De plus, il initie un processus pro-apoptotique par la régulation de la phosphorylation de Bad (Ibata-Ombetta, *et al.*, 2003, Ibata-Ombetta, *et al.*, 2003).

Son rôle tenu dans l'infection à *C. albicans* est à déterminer. L'injection de PLM à des souris entraîne une augmentation de la mortalité et provoque l'induction d'un choc par la sécrétion de TNF- $\alpha$  (Trinel, *et al.*, 1997).

### 3- Les glycoprotéines

Les glycoprotéines sont très abondantes dans la paroi. Elles ont de multiples fonctions structurales ou enzymatiques. Certaines d'entre-elles possèdent des propriétés immunostimulatrices sur les macrophages (Vecchiarelli, *et al.*, 1991).

Par exemple, MPF2 (Mannoprotein fraction 2) ainsi que SMP200 (Stress Mannoprotein 200) induisent la production de TNF- $\alpha$  (Pitzurra, *et al.*, 1996, Torosantucci, *et al.*, 1997).

MP65 est une mannoprotéine de 65 kDa, codant pour une  $\beta$ -glucanase. Elle se lie aux macrophages et induit la sécrétion de cytokines (Pitzurra, *et al.*, 1996, Sandini, *et al.*, 2007, Pietrella, *et al.*, 2008).

### 4- Les $\beta$ -glucanes

Les  $\beta$ -glucanes ont été le sujet de nombreuses études (Heinsbroek, *et al.*, 2005, Gow, *et al.*, 2007, Taylor, *et al.*, 2007, Torosantucci, *et al.*, 2009). En effet, il est peu exposé à la paroi et se lie à la Dectine-1 et au TLR2 afin de moduler les voies de signalisation (Gantner, *et al.*, 2003, Gantner, *et al.*, 2005). Il est à l'origine de la production de cytokines pro-inflammatoires (Brown & Gordon, 2001, Brown, *et al.*, 2003) et de chimiokines (Torosantucci, *et al.*, 2000). Des études récentes indiquent qu'il induit la production de ROS suite à l'interaction avec les macrophages (Wellington, *et al.*, 2009).

### 5- La chitine

La chitine constitue le squelette de la paroi de *C. albicans*. Son rôle dans la pathogénicité est encore peu connu. Des études démontrent que l'efficacité de la destruction de la levure préalablement traitée avec de la chitine est amplifiée (Suzuki, *et al.*, 1987).

Elle potentialise la phagocytose et l'activité candidacide des macrophages péritonéaux de souris mais ne stimule pas la production de ROS (Rementeria, *et al.*, 1997). De plus, elle

exerce une activité immunomodulatrice via la sécrétion de cytokine (IL1- $\beta$ ) (van de Veerdonk, *et al.*, 2009).

#### 6- Les $\beta$ -1,2 oligomannosides

Les  $\beta$ -1,2 oligomannosides ont été décrits chimiquement et exclusivement sur deux molécules : le mannane et le PLM. Ils sont présents chez les espèces les plus pathogènes du genre *Candida* et sont considérés comme des facteurs de virulence. Ils sont reconnus par la galectine-3. Leur détection est très spécifique et dépendante de leur configuration spatiale (Fradin, *et al.*, 2000, Jouault, *et al.*, 2001, Kohatsu, *et al.*, 2006).

Ce sont de puissants immunostimulateurs. En effet, ils se fixent au macrophage (Fradin, *et al.*, 1996) et stimulent la synthèse de cytokines, particulièrement le TNF- $\alpha$  (Jouault, *et al.*, 1995). Cette synthèse est dépendante du degré de polymérisation : une activité optimale est observée au delà de 8 (Jouault, *et al.*, 1995). Ce sont aussi des dérégulateurs des fonctions macrophagiques. Ils favorisent la production de dérivés de l'acide arachidonique à l'origine d'une désensibilisation des cellules (Jouault, *et al.*, 2000). De même, ils modulent les voies de transduction de signaux (MEK, ERK, p90RSK) et initient l'apoptose pour permettre la survie des levures après phagocytose par le macrophage (Ibata-Ombetta, *et al.*, 2003, Ibata-Ombetta, *et al.*, 2003).

Ils jouent un rôle important dans le développement de l'infection à *C. albicans*. Des expériences réalisées à partir d'un mutant dont l'expression des  $\beta$ -1,2 oligomannosides est diminuée, présentent une virulence atténuée (Mille, *et al.*, 2004). De plus, une réponse IgG3 dirigée contre  $\beta$ -1,2 oligomannosides liés au mannane et au PLM est détectée chez les patients atteints de candidoses (Poulain, *et al.*, 1993). Les tests diagnostics actuels des candidoses reposent sur cette production d'anticorps (Sendid, *et al.*, 1999, Sendid, *et al.*, 2002).

## B. Récepteurs macrophagiques impliqués dans l'interaction *C. albicans*/ macrophages

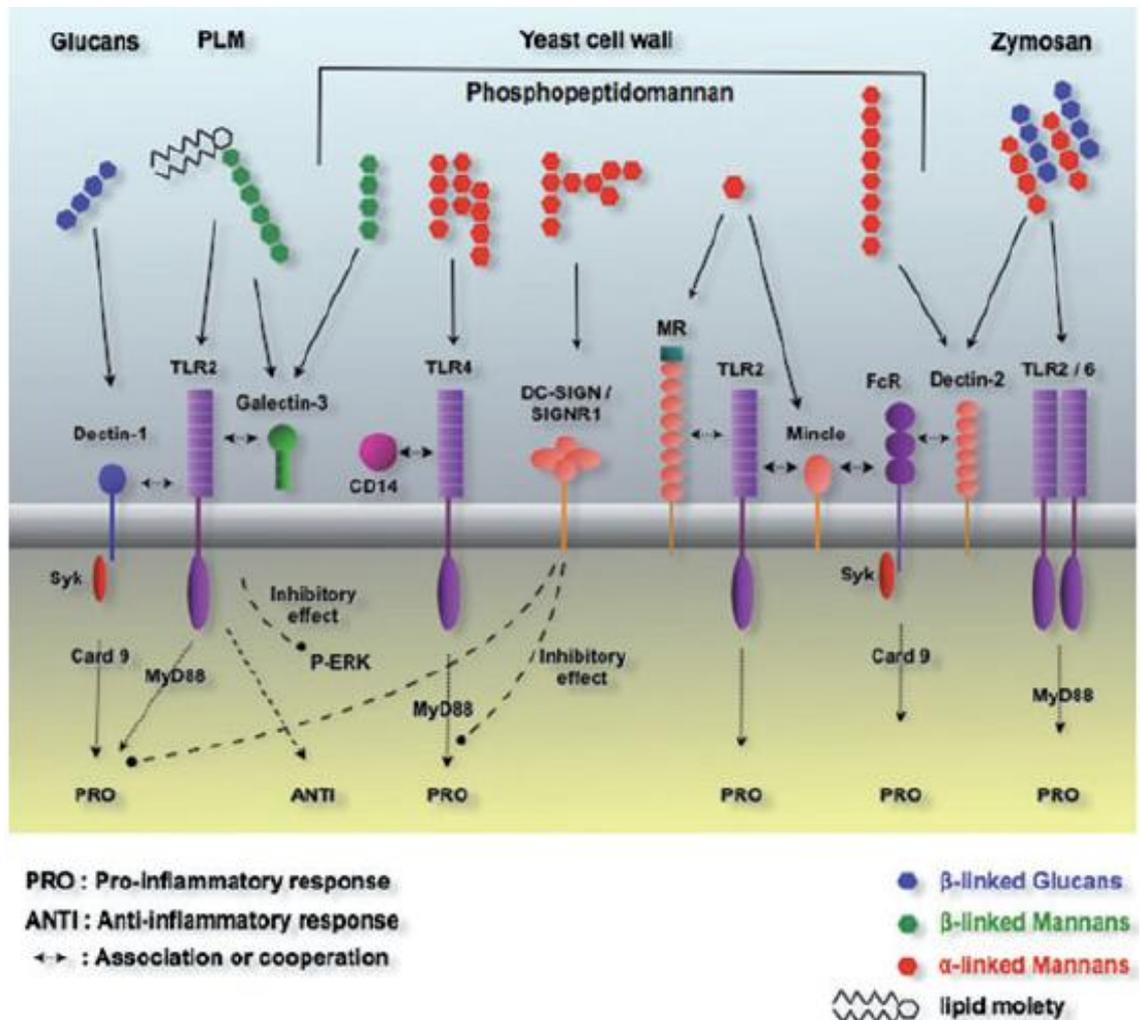


Fig 11 : Interactions des principaux PRRs avec les PAMPs des levures et les réponses cellulaires induites. D'après Jouault *et al*, 2009.

### 1- Récepteurs macrophagiques opsoniques

La paroi de *C. albicans* représente l'interface majeure entre le pathogène et les phagocytes. Les macrophages sont capables de reconnaître la levure via leurs récepteurs spécifiquement dirigés contre les glycanes de la paroi. La détection de la levure conduit à sa phagocytose permettant son élimination. Les interactions mises en jeu lors de la reconnaissance et de la phagocytose sont complexes. Elles font appel à des interactions de type ligands-récepteurs, des interactions non-spécifiques et des réactions spécifiques, non opsoniques et opsoniques.

a. Récepteur pour le fragment du complément

Les opsonines non spécifiques sont capables de se fixer sur la paroi de *C.albicans* pour participer à un complexe levure-opsonine-récepteurs macrophagiques. Les macrophages expriment trois récepteurs pour le fragment du complément. Deux récepteurs assurent la reconnaissance du C3bi : CR3 et CR4. Ils sont hétérodimériques, constitués pour le CR3 des sous unités CD11b et CD18 (CR3), et pour le CR4, de l'association CD11c /CD18 (Ross, *et al.*, 1985, Lee, *et al.*, 1997, Calderone, 2002). Le CR1 quant à lui reconnaît le fragment C3b. Ils appartiennent à la famille des intégrines. Ils sont présents chez les macrophages, les monocytes, les NK et les neutrophiles. Ils sont impliqués dans l'opsonisation de la levure, facilitent les contacts cellulaires et médient la phagocytose. Des études réalisées *in vivo* indiquent que le système du complément est important dans la résistance innée contre *Candida* (King, *et al.*, 2000).

b. FcRs

De façon synergique, le phagocyte va reconnaître les complexes RFc-Ac-Ag formés. Le fragment Fc des immunoglobulines G (IgG) est reconnu par les récepteurs Fc (Cox & Greenberg, 2001) au nombre de 3 : FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) et FcγRIII (CD16). L'expression de ces récepteurs dépend de la maturation de la cellule. Ils contribuent à l'activation de la phagocytose, la production de molécules fongicides, et promeut la production de cytokine et chimiokine (Calderone, 2002).

c. MBL

La MBL (Mannan Binding Lectin) ou encore nommée MBP (Mannose/mannane Binding Protein) est une lectine multimérique composée de sous unités de 32 kDa et appartient à la famille des collectines. Les MBPs sont des protéines plasmatiques reconnaissant des structures présentes à la surface des bactéries et des virus via leur CDR (domaine carbohydrate) (Holmskov, *et al.*, 1994). Cette lectine possède une structure analogue à celle du C1q permettant l'activation de la voie classique menant à la phagocytose du pathogène (Ohta, *et al.*, 1990).

## 2- Récepteurs macrophagiques non opsoniques

Comme décrit précédemment, *C. albicans* présente de nombreuses structures saccharidiques, dont elle module l'expression en fonction de son environnement. Outre le système opsonique, chacune de ces structures est reconnue spécifiquement par des récepteurs non opsoniques de 2 types : lectinique et de signalisation au niveau de la cellule macrophagique.

### A. Récepteurs lectiniques

#### 1. Récepteurs aux $\beta$ -glucanes

Les  $\beta$ -glucanes de la paroi des levures sont reconnus par 3 récepteurs différents : le CR3,  $\beta$ -glucanes receptors, la Dectine-1.

Le CR3 est un récepteur multifonctionnel pouvant fixer divers ligands tels que le C3bi, fibrinogène, le LPS. Il possède un site lectinique impliqué dans la reconnaissance de polysaccharides fongiques tels que la N-acetylglucosamine, le zymosan, les  $\beta$ -glucanes et methylglucoside (Thornton, *et al.*, 1996, Xia, *et al.*, 1999).

Des études ont indiqué que le CR3 ne jouait pas un rôle essentiel dans la phagocytose du zymosan et de *C. albicans*. Cependant, il s'accumule au niveau des synapses phagocytaires et semble être impliqué dans la reconnaissance de la levure (Heinsbroek, *et al.*, 2008).

De même, il est possible qu'il interagisse avec d'autres récepteurs notamment la Dectine-1 durant la capture des particules fongiques et lors de l'adhérence (Graham, *et al.*, 1989, Tang, *et al.*, 1997, Jongstra-Bilen, *et al.*, 2003, Rubin-Bejerano, *et al.*, 2007).

De moindre importance, les «  $\beta$ -glucans receptors » sont des protéines de 160 à 180 Kda, exprimées par les monocytes et les macrophages reconnaissant des  $\beta$ -1,3 glucanes (Muller, *et al.*, 1996).

La dectine-1 (« DC-Associated C-type Lectin-1 ») est un récepteur lectinique de type C, possédant un seul domaine lectinique et un domaine intracellulaire ITAM. Elle est exprimée par les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les CD et les cellules de Langerhans (Brown & Gordon, 2001, Taylor, *et al.*, 2002). Elle reconnaît les  $\beta$ -glucanes de nombreux champignons : *C. albicans*, (Brown, *et al.*, 2003), *Aspergillus fumigatus* (Steele,

*et al.*, 2005), *Pneumocystis carinii* (Steele, *et al.*, 2003) et *Coccidioides posadasii* (Viriyakosol, *et al.*, 2005).

L'expression de la Dectine-1 est dépendante du type d'infection (Ozment-Skelton, *et al.*, 2009). C'est le principal récepteur impliqué dans la phagocytose de *C. albicans* par les macrophages (Gantner, *et al.*, 2005, Heinsbroek, *et al.*, 2008). La dectine-1 a été décrite comme un co-récepteur du TLR2, déclenchant une réponse de type pro-inflammatoire via la sécrétion de TNF- $\alpha$ . (Gantner, *et al.*, 2003, Viriyakosol, *et al.*, 2005). Elle est impliquée dans la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires telles que TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10 (Herre, *et al.*, 2004, LeibundGut-Landmann, *et al.*, 2007, van de Veerdonk, *et al.*, 2009). La production de cytokines par la Dectine-1 est orientée à travers deux voies de signalisation : Syk-dépendante et Syk-indépendante (Rogers, *et al.*, 2005, Gow, *et al.*, 2007). Des études ont démontré que la Dectine-1 participait à la maturation des CD par l'activation de Syk (Skrzypek, *et al.*, 2009). De plus, elle agit sur la différenciation des lymphocytes T helper via syk et raf-1 (Gringhuis, *et al.*, 2009). Enfin, elle est impliquée dans la régulation de la phospholipase A2 (PLA2), du choc oxydatif et de la cyclooxygénase-2 (COX-2) (Gantner, *et al.*, 2003, Suram, *et al.*, 2006).

Ces résultats suggèrent que la Dectine-1 initierait les réponses immunes innée et adaptative, contribuant ainsi au contrôle du développement de l'infection à *C. albicans*.

Cependant, l'épitope spécifiquement détecté, se concentre en un domaine restreint au niveau de la surface de la levure et dans la région de jonction entre la cellule mère et la cellule fille, mais n'est plus accessible sur la forme mycélienne (Gantner, *et al.*, 2005, Underhill, 2007). Sa fonction dans la lutte contre les infections à *C. albicans* est controversée. En effet, Saijo *et al* ont montré que la Dectine-1 jouait un rôle mineur dans le contrôle de l'infection à *C. albicans* via les résultats obtenus d'infection de souris KO Dectine-1. En revanche, Taylor *et al* signalent que la production de cytokine et de chimiokines médiées par la Dectine-1 conduit au recrutement des cellules inflammatoires nécessaires au contrôle de l'infection (Dennehy & Brown, 2007, Saijo, *et al.*, 2007, Taylor, *et al.*, 2007). Enfin, une étude récente indique la Dectine-1 est essentielle dans la défense des infections fongiques et que l'expression de celle-ci est sous le contrôle de PPAR $\gamma$  (Gales, *et al.*, 2010).

Récemment, Mincle, également connu sous le nom de Clec4e et Clecsf9 a été décrit. Cette lectine de type C est impliquée dans la reconnaissance de *C. albicans* et de *S. cerevisiae*. Son ligand reste à identifier. Cependant, il a un patron d'expression similaire à

la Dectine-1 et 2 (Wells, *et al.*, 2008). Il est exprimé par les macrophages, les CD et les cellules B (Flornes, *et al.*, 2004).

Son expression est augmentée après stimulation par la levure ou suite à la production d'IFN. Il n'est pas impliqué directement dans la phagocytose mais dans la détection précoce et la signalisation de *C. albicans* dans le phagosome. Il se lie avec le TLR2 et joue un rôle dans la sécrétion de TNF- $\alpha$ . Une augmentation de la colonisation par la levure dans les reins est observée chez des souris KO Mincle (Bugarcic, *et al.*, 2008, Wells, *et al.*, 2008).

## 2. Récepteurs des $\alpha$ -mannosides

Quatre récepteurs sont impliqués dans la reconnaissance des  $\alpha$ -mannosides : MR, DC-SIGN, Dectine-2 et galactose specific receptor.

Le Mannose récepteur ou MR est une protéine de 180 kDa comportant 5 domaines riches en cystéine. Il est exprimé par les macrophages et les CD non matures. Il reconnaît des carbohydrates riches en résidus mannose, lui permettant de détecter de nombreux microorganismes et virus (*Leishmania*, HIV,...) (Tarnowski, *et al.*, 1988, Shepherd, *et al.*, 1991, Sallusto, *et al.*, 1995, Vazquez-Torres & Balish, 1997, Takahashi, *et al.*, 1998, Linehan, *et al.*, 1999).

La reconnaissance des résidus mannose de la paroi de *C. albicans* par le MR s'effectue via les mannoses N-glycosylés, tandis que les mannoses O-glycosylés seraient reconnus par le TLR4 (Netea, *et al.*, 2006).

Le MR participe à la phagocytose de *C. albicans* et à l'initiation de la production de cytokines telles qu'IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17, MC-P1 par les macrophages (Karbassi, *et al.*, 1987, Marodi, *et al.*, 1991, Porcaro, *et al.*, 2003, Netea, *et al.*, 2006, Gow, *et al.*, 2007, van de Veerdonk, *et al.*, 2009). Le rôle exact tenu par le MR lors de la phagocytose de *C. albicans* est discuté. (Le Cabec, *et al.*, 2005, Willment & Brown, 2008). Des cellules n'exprimant pas de MR sont capables de reconnaître des  $\alpha$ -mannosides (Le Cabec, *et al.*, 2005).

Une étude indique que le MR ne jouerait pas de rôle dans les étapes précoces de la phagocytose mais à l'intérieur du phagosome (Heinsbroek, *et al.*, 2008). Galès *et al* spécifient que le MR est important dans les interactions *C. albicans* non opsonisé-macrophages M2 (MR fortement exprimés dans ce contexte) (Gales, *et al.*, 2010).

D'autre part, les résultats de Lee *et al* signalent que le taux de survie des souris MR (-/-) à une candidose systémique est égal à celui des souris sauvages, mais qu'elles présentent un

nombre de levures plus élevé dans les organes cibles de *C. albicans*. Ainsi, la fonction du MR dans les candidoses systémiques ne serait que mineur (Lee, *et al.*, 2003).

Contrairement au MR, les DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM (intracellular adhesion molecule)-grabbing non integrin) reconnaissent des structures mannosidiques ramifiées. Exprimés par les CD et les macrophages, ils font partie tout comme les MR, des lectines du type C, protéine membranaire de type 2, formant un tétramère à la surface des cellules. Il intervient dans la fixation de parasites (*Leishmania*, *Mycobacteria*), de virus (VIH, Ebola, SIV) et de levure (*C. albicans*) (Geijtenbeek, *et al.*, 2000, Colmenares, *et al.*, 2002, Cambi, *et al.*, 2003). DC-SIGN est un des récepteurs d'ICAM 3 dont l'interaction est responsable de la prolifération des lymphocytes T naïfs induite par les CD ainsi qu'ICAM 2, support de la migration transendothéliale des CD (Geijtenbeek, *et al.*, 2000). Il initie la réponse immunitaire adaptative par le processing et la présentation d'antigène et dans une moindre mesure, la phagocytose et la destruction de la levure par les CD (Netea, *et al.*, 2004). DC-SIGN lie et internalise *C. albicans* via la reconnaissance du N-mannane constituant la paroi (Cambi, *et al.*, 2003, Cambi, *et al.*, 2008). Il peut moduler les signaux intracellulaires induits par les TLRs via l'acétylation de la kinase Raf-1 (Gringhuis, *et al.*, 2007). Il est impliqué dans la production de cytokines telles qu'IL-10, IL-6, TNF- $\alpha$  par les CD (Netea, *et al.*, 2004, Gringhuis, *et al.*, 2007).

Le SIGNR1 contribue à la reconnaissance de *C. albicans*, facilite la sécrétion de TNF- $\alpha$  et concourt à la phagocytose par les macrophages (Taylor, *et al.*, 2004, Nagaoka, *et al.*, 2005).

La Dectine-2 est distribuée sur les macrophages, cellules de Langerhans et les CD. Cette lectine de type C reconnaît une structure spécifique de 8 mannoses (McGreal, *et al.*, 2006). Ce récepteur est le seul à interagir préférentiellement avec la forme mycélienne de *C. albicans*, ainsi qu'avec les hyphes de *Microsporium audouinii* et *Trichophyton rubrum*. Les formes levures sont peu reconnues. Son expression est augmentée lors de l'inflammation, notamment celle induite par *C. albicans* (Ariizumi, *et al.*, 2000, Taylor, *et al.*, 2005).

La Dectine-2 peut s'associer avec le récepteur Fc $\gamma$ R pour induire l'internalisation, l'activation de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B et augmenter la production de cytokines (TNF- $\alpha$  et IL-1) (Sato, *et al.*, 2006). De plus, des expériences récentes indiquent qu'elle activerait les CD via la voie de signalisation Syk-CARD9 et qu'elle régulerait la réponse immunitaire adaptative lors d'une infection fongique (Robinson, *et al.*, 2009).

### 3. Galectine-3

La galectine-3 (anciennement Mac-2) est une lectine soluble possédant un site de reconnaissance aux carbohydrates (CDR). Cette protéine de 32 Kda est exprimée à la surface des macrophages, CD, kératinocytes et fibroblastes. Elle est impliquée dans la reconnaissance de différents glycolipides bactériens tels que le LPS. Elle intervient dans la régulation de l'homéostasie des cellules immunitaires (Rabinovich & Gruppi, 2005). La galectine-3 participe au processus inflammatoire en recrutant les neutrophiles au niveau des tissus infectés, dans la reconnaissance et destruction des bactéries via la libération de ROS par les phagocytes (Almkvist & Karlsson, 2004).

Elle est à l'origine de la détection spécifique de *C. albicans*. En effet, elle est impliquée dans la reconnaissance des  $\beta$ -1,2 oligomannosides (Fradin, *et al.*, 2000). Elle intervient dans l'inflammation induite par *C. albicans*, la réponse TLR2 (Jouault, *et al.*, 2006) et dans la production de cytokines tel que le TNF- $\alpha$  (Dromer, *et al.*, 2002, Jawhara, *et al.*, 2008). Des études indiquent de plus qu'elle posséderait une puissante activité antifongique (Kohatsu, *et al.*, 2006).

## B. Récepteurs microbiologiques ou PRRs (Pattern Recognition Receptors)

### 1. TLRs

Au nombre de 13 chez la souris et 10 chez l'homme, les TLRs (Toll like receptor) sont une famille de récepteurs transmembranaires de type 1, exprimés par de nombreuses cellules.

Ces récepteurs sont ainsi capables de reconnaître les PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns), motifs conservés présents chez les microorganismes mais absents chez les eucaryotes supérieurs. Ils possèdent un domaine extracellulaire riche en leucine (LRR pour « Leucine Rich Repeat Domain »), responsable de la reconnaissance des ligands (Bell, *et al.*, 2003) et un domaine intracellulaire TIR (« Toll/Interleukin-1 Receptor »), impliqué dans la transduction des signaux (Takeda & Akira, 2004). Les TLRs jouent un rôle crucial dans la réponse immunitaire innée et acquise.

Les TLR2 et TLR4 semblent être les plus impliqués dans la reconnaissance des levures et jouent un rôle dans le développement de l'infection par *C. albicans*. Le TLR4 reconnaît en association avec le CD14, le mannane de *C. albicans* et de *Saccharomyces*

*cerevisiae* (Tada, *et al.*, 2002). Un polymorphisme touchant le TLR4 augmente la susceptibilité à l'infection par *C. albicans* (Van der Graaf, *et al.*, 2006). D'ailleurs, des macrophages de souris mutés pour le TLR4 montrent une altération de la sécrétion de chimiokines et un défaut de recrutement des neutrophiles. Cependant, la production de cytokines pro-inflammatoires est normale (Netea, *et al.*, 2002). Le TLR2 coopère avec la dectine-1 pour stimuler les cellules en réponse aux  $\beta$ -glucanes présents à la paroi de *C. albicans* (Brown, 2006) de même, qu'avec la galectine-3.

Bellocchio *et al* ont examiné l'activité antifongique des neutrophiles de souris sauvages, TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, TLR9<sup>-/-</sup>, IL-1R<sup>-/-</sup> et Myd88<sup>-/-</sup>. Cette fonction contre les levures et les hyphes est diminuée pour les neutrophiles issus de souris IL-1R<sup>-/-</sup> et Myd88<sup>-/-</sup>. L'activité antifongique des neutrophiles des souris TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, TLR9<sup>-/-</sup> n'est pas affectée ou très peu augmentée. De même, ils ont observé une diminution d'IFN $\gamma$  et une augmentation d'IL-4 chez les souris TLR2<sup>-/-</sup>, TLR4<sup>-/-</sup>, TLR9<sup>-/-</sup>, IL-1R<sup>-/-</sup> et Myd88<sup>-/-</sup> comparé aux souris sauvages (Bellocchio, *et al.*, 2004). Une autre étude indique que la neutralisation du TLR2 et le TLR4 inhibe la synthèse de PGE2 par les cellules HeLa (Deva, *et al.*, 2003).

Des études ont montré qu'en fonction de la forme adoptée par la levure, la reconnaissance et la réponse cytokinique, variaient. En effet, le TLR2 et le TLR4 reconnaissent des blastoconidies tuées par la chaleur et induisent la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IFN $\gamma$  par des cellules mononucléaires. La forme mycélienne, quant à elle, n'est détectée que par le TLR2 et conduit à une légère production de TNF- $\alpha$  (van der Graaf, *et al.*, 2005). De plus, des travaux réalisés à partir de souris KO pour le TLR2 ou le TLR4 indiquent que les souris KO TLR2 sont plus résistantes à l'infection par *C. albicans* que les souris KO TLR4. *C. albicans* induit une immunosuppression à travers le TLR2 qui augmente la production d'IL-10 et la survie des Treg (Netea, *et al.*, 2004). De même, ces macrophages ont une efficacité de phagocytose et de lyse augmentée par rapport aux macrophages des souris sauvages (Blasi, *et al.*, 2005). Cependant, une autre étude réalisée récemment indique que l'absence de TLR2 conduit à une baisse des chimiokines par les neutrophiles, favorisant la dissémination du pathogène dans les ganglions lymphatiques et la rate. L'exsudat inflammatoire de souris TLR2<sup>-/-</sup> contient une plus grande proportion de macrophages et de neutrophiles apoptotiques. De plus, l'activité phagocytaire des neutrophiles et macrophages ainsi que la production d'oxyde nitrique, de même que l'activité myéloperoxydase sont réduites (Tessarolli, *et al.*, 2009).

Des données expérimentales montrent que l'augmentation de la susceptibilité à une candidose disséminée est liée à l'âge des souris. Elle est de surcroît corrélée à une réduction de l'expression du TLR2 et de production de cytokine mais sans altération de l'activité fongicide (Murciano, *et al.*, 2008). De plus, la voie TLR2/Dectine-1 mais pas TLR4 ou NOD2, amplifie la production d'IL-17 induit par le MR (van de Veerdonk, *et al.*, 2009).

Les travaux réalisés au laboratoire ont montré que le PLM de la paroi de *C. albicans* menait la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages via l'association TLR2/galectine-3 (Jouault, *et al.*, 2003). De plus, des levures vivantes administrées oralement par gavage à des souris indiquent qu'une stimulation induite par *C. albicans* nécessite l'association TLR2/galectine-3 (Jawhara, *et al.*, 2008).

La reconnaissance de *C. albicans* par le TLR6 module la balance entre les cytokines de type Th1 et Th2. En effet, la production d'IL-10 est altérée tandis que l'IFN $\gamma$  libéré est augmenté dans des souris KO TLR6. Alors que la production TNF- $\alpha$ , IL-1 et d'IL-6 et la susceptibilité des souris à une candidose disséminée sont identiques que les souris sauvages (Netea, *et al.*, 2008).

A partir des différents travaux effectués, il a été démontré que les TLRs participaient de manière essentielle au développement d'une réponse immunitaire adaptée contre *C. albicans*.

## 2. Les molécules accessoires des TLRs

Un certain nombre de molécules accessoires sont indispensables pour la reconnaissance des microorganismes, mais aussi pour la signalisation et la modulation de la réponse immune par les TLRs.

- CD14

CD 14 est une glycoprotéine de 55 kDa ancrée à la membrane plasmique par une ancre GPI. Cette molécule potentialise la réponse au LPS en se liant et en facilitant le transfert au complexe TLR4/MD-2 (Latz, *et al.*, 2002). CD14 interagit avec le TLR2 et le TLR4 de façon ligand dépendante (Schmitz & Orso, 2002, Akashi-Takamura & Miyake, 2008).

Récemment, il a été décrit que le CD14 participait non seulement à la reconnaissance de ligands mais aussi à la réponse intracellulaire. Il peut agir comme un transporteur de ligands et comme un potentialisateur de signaux via le recrutement de rafts lipidiques. De plus, CD14 interagit avec de nombreux TLRs pour induire la production de cytokines après infections virales ou bactériennes (Finberg & Kurt-Jones, 2006, Lee, *et al.*, 2006).

Le CD14 est impliqué dans la reconnaissance du mannane de *C. albicans* et de *S. cerevisiae* en coopération avec le TLR4 qui mène à la production de TNF- $\alpha$  (Tada, *et al.*, 2002). De plus, les gènes codants pour le CD14, IL-15 et le récepteur à IL-13 sont tenus sous silence suite à 18h d'exposition à *C. albicans* (Kim, *et al.*, 2005).

- Nod

Les protéines Nod (Nucleotide Oligomerization Domain) sont des protéines intracellulaires appartenant à la famille des PRRs. Elles sont impliquées dans la surveillance intracellulaire en repérant des composants microbiens comme le peptidoglycane des bactéries (Inohara, *et al.*, 2001, Girardin, *et al.*, 2003). Elles ont un rôle non négligeable dans la lutte contre les infections (Inohara, *et al.*, 2005, Shaw, *et al.*, 2008).

Nod2, encore appelée CARD15, est une protéine de 115 kDa et est exprimée sur les monocytes, macrophages, CD et cellules de Paneth. Nod2 est nécessaire et suffisante pour activer NF- $\kappa$ B (Inohara, *et al.*, 2005, Franchi, *et al.*, 2008).

Des mutations de Nod2 sont associées à des maladies humaines auto-immunes notamment la maladie de Crohn (Hugot, *et al.*, 2001). Des études ont montré que Nod2 aurait un effet synergique avec le TLR2 ou le TLR4 (Netea, *et al.*, 2005). Cependant, il semble être peu impliqué dans la détection de *C. albicans* (van der Graaf, *et al.*, 2006).

Le rôle de Nod2 dans la reconnaissance et la défense de l'hôte vis-à-vis des infections à *C. albicans* est encore obscur.

### C. Stimulation des macrophages par *C. albicans* et ses composants

Les interactions entre les différents composants (glycannes, protéines pariétales, etc...) de *C. albicans* et les récepteurs macrophagiques conduisent à la discrimination de cette levure et à la stimulation du macrophage.

En effet, cette reconnaissance spécifique mène à la mise en place de multiples événements cellulaires. Certains récepteurs macrophagiques sont des protéines transmembranaires tyrosines kinases, impliquées dans les échanges GDP/GTP et dans l'activation de la voie des Mapk (ERK1/2, SAPK/JNK et p38). De plus, chacun des TLRs engagé est capable de recruter une combinaison spécifique d'adaptateurs comme MyD88, TIRAP, TRIF et TRAM, afin activer différentes voies de signalisation : voie de signalisation dépendante et/ou indépendante de MyD88. La Dectine-1 est en elle-même apte à induire des voies de signalisation intracellulaire (Syk, MyD88, NF- $\kappa$ B) (Rogers, *et al.*, 2005, Brown, 2006, Gross, *et al.*, 2006, Hara, *et al.*, 2007, Hsu, *et al.*, 2007).

Toutes ces voies de signalisation régulées par les stimuli perçus conduisent à l'élaboration de réponses cellulaires. Des processus mécanistiques tels que la phagocytose, le relargage de substances microbicides, vont être mis en place via l'activation ou la répression de gènes et de facteurs de transcription. D'autre part, cette stimulation conduit à la synthèse de cytokines. Le TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-18 et IL-6 sont des cytokines pro-inflammatoires tandis qu'IL-10 et IL-4 sont des cytokines anti-inflammatoires. Toutes sont sécrétées rapidement par les phagocytes suite à l'interaction avec *C. albicans* (Calderone, 2002, Janeway, 2003).

De cette façon, le TNF- $\alpha$  régule le recrutement des cellules phagocytaires, induit l'expression de molécules co-stimulatrices et stimule la phagocytose par les macrophages, la production d'IL-1 et de prostaglandine E2. Il est essentiel dans le contrôle des candidoses systémiques.

L'IL-10 est pour sa part capable d'inhiber la synthèse d'IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-3, TNF- $\alpha$  et GM-CSF par les macrophages et les cellules Th1. Elle stimule les thymocytes et les cellules B. De plus, elle est sécrétée en réponse à la forme mycélienne de *C. albicans* et inhibe le

développement d'une réponse cellulaire protectrice (Mencacci, *et al.*, 1998, d'Ostiani, *et al.*, 2000, Roilides, *et al.*, 2000, Bozza, *et al.*, 2004, Camargo, *et al.*, 2009).

Ainsi, ces différentes cytokines ont un rôle essentiel aussi bien dans l'élaboration de la réponse immunitaire innée via l'activation des macrophages et des lymphocytes NK que dans la mise en place de la réponse immunitaire spécifique par les lymphocytes T et B. Ce sont elles qui vont permettre l'instauration d'une réponse immune pertinente, élaborée contre *C. albicans*, déterminant l'évolution de l'infection.

## **ARTICLE 1**

Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs  
interplay leading to tolerance or infection by  
*Candida albicans*

## Microreview

Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*

Thierry Jouault,<sup>1,2\*</sup> Aurore Sarazin,<sup>1,2</sup>  
Maria Martinez-Esparza,<sup>4</sup> Chantal Fradin,<sup>1,2</sup>  
Boualem Sendid<sup>1,2,3</sup> and Daniel Poulain<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Inserm U799 and <sup>2</sup>Université Lille 2, Faculté de Médecine H. Warembourg, Pôle Recherche, Place Verdun, 59037 Lille Cedex, France.

<sup>3</sup>Centre Hospitalier Universitaire de Lille, 59037 Lille Cedex, France.

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica B e Inmunología, Facultad de Medicina. Universidad de Murcia, Murcia, Spain.

## Summary

The molecular interactions between commensal microorganisms and their host are basically different from those triggered by pathogens since they involve tolerance. When the commensal is genetically equipped to become an opportunistic pathogen, as is the case with *Candida albicans*, the picture becomes more complex. In this case, the balance between protection and invasion depends on host reactivity to altered microbial expression of ligands interacting with innate immune sensors. Based on experimental evidence obtained with *C. albicans*, we discuss the different molecular processes involved in the sensing of this important opportunistic human pathogen by a panel of pattern recognition receptors (PRRs) according to the numerous pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) that can be exposed at its surface. Beneficial or deleterious immune responses that either maintain a commensal state or favour damage by the yeast result from this dynamic interplay.

## Introduction

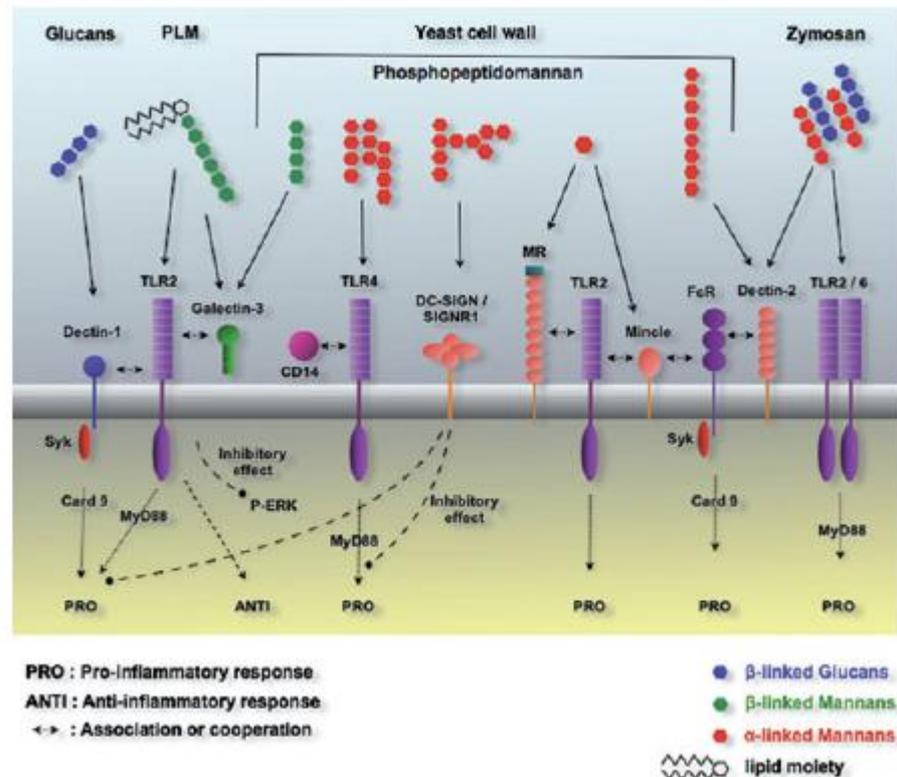
To distinguish friend from foe, the immune system has evolved receptors that recognize molecules present on pathogenic microorganisms. These receptors, referred to as pattern recognition receptors (PRRs), function to promote the innate immune response, which is mainly described as a pro-inflammatory response. PRRs bind to conserved microbial structures called pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). PRRs include membranous Toll-like receptors (TLRs) and lectins, which confer additional extracellular surveillance mechanisms promoting phagocytosis and signalling (Mukhopadhyay *et al.*, 2004; Taylor *et al.*, 2005). The expression of these receptors allows the immune system to recognize a wide variety of pathogens that individually express one or several of these PAMPs. Their engagement initiates an early immune response dedicated to the killing of the pathogen while enabling organization of the adaptive response.

*Candida albicans* as a prototype of commensal

In contrast to pathogens, commensal microorganisms persistently colonize the host without causing any symptoms. The yeast *Candida albicans* is one of the most common human commensals. It colonizes the mucocutaneous surfaces of the oral cavity, gastrointestinal tract and vagina. Under certain host circumstances, *C. albicans* can proliferate in a saprophytic state and can become pathogenic. Among the host conditions favouring *C. albicans* proliferation in the gut and subsequent systemic infections are those encountered in hospital inpatients. In such 'at-risk patients', medico-surgical treatment of severe underlying disease and prevention of bacterial infection by broad-spectrum antibacterial antibiotics induce *C. albicans* proliferation and saprophytic-pathogenic transition. Given the high levels of morbidity and mortality associated with nosocomial candidiasis, the pathogenic adaptation of *C. albicans* has been the topic of extensive investigations (Calderone, 2002).

Received 13 November, 2008; revised 8 January, 2009; accepted 8 January, 2009. \*For correspondence. E-mail tjouault@univ-lille2.fr; Tel. (+33) 3 20 62 34 15; Fax (+33) 3 20 62 34 16.

© 2009 Blackwell Publishing Ltd

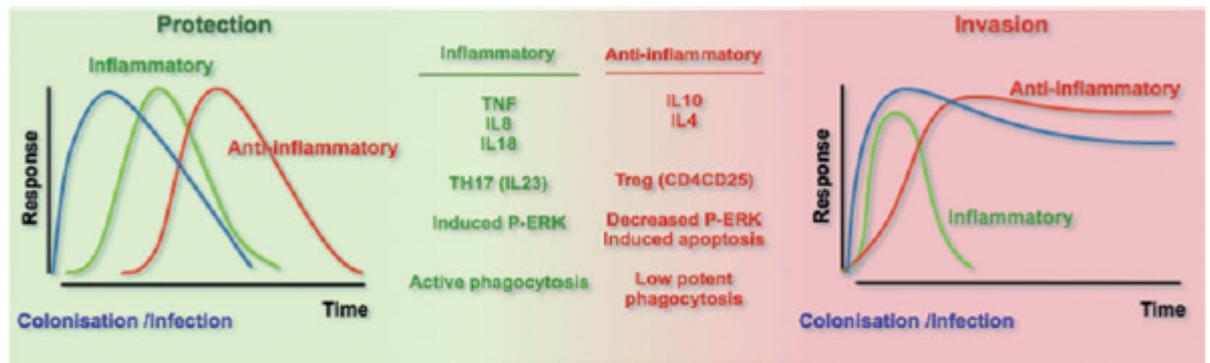


**Fig. 1.** Main host PRRs interacting with yeast PAMPs, and their association that initiates the cellular response. Surface glycans, which are the major yeast PAMPs, are recognized by several specific PRRs. The resulting response depends on the expression of PRRs available at the host cell surface, but also on the expressed PAMPs which are modulated according to the host cell environment, and are recognized by different specific lectins which act as co-receptors for TLRs.

#### Yeast PAMPs and their relation with host PRRs

It is now known that the protective response to fungal exposure is initiated by host recognition of specific PAMPs, which leads to a pro-inflammatory response (Netea *et al.*, 2008). Through different approaches based on the use of either purified or synthetic individual molecules, purified complexes, or yeasts deleted for genes involved in PAMP synthesis, it has been possible to determine that recognition is mainly based on expression of components within the yeast cell wall, which is a complex structure composed of glycans, either as glucans and chitin – present in the deeper layers of the cell wall – or saccharidic moieties of mannan, mannoproteins and glycolipids – expressed at the cell wall surface (Jouault *et al.*, 1995; 2000; Fradin *et al.*, 1996; 2000; Tada *et al.*, 2002; Netea *et al.*, 2004a; 2006; Poulain and Jouault, 2004; Pietrella *et al.*, 2006). Faced with these polysaccharides and glycoconjugates, several lectins have been shown to act either independently or in cooperation with TLRs or other signalling receptors, to recognize surface sugars of yeasts for induction of the cell response (Fig. 1). Notably, dectin-2, which

recognizes high mannoses (McGreal *et al.*, 2006), associates with Fc receptor gamma (FcRgamma) chain (Sato *et al.*, 2006). Macrophage mannose receptor (MR), which recognizes fungal mannan and mediates recognition and phagocytosis of yeasts by macrophages (Stahl and Ezekowitz, 1998), has been shown to associate with TLR-2 during stimulation by fungi such as *Pneumocystis* (Tachado *et al.*, 2007). DC-SIGN, another C-type lectin, is able to internalize *C. albicans* (Cambi *et al.*, 2003) by recognizing complex mannoside structures exposed on yeast cells (Cambi *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2004) and a regulatory role on TLR-4-dependent signalling has been demonstrated for SIGNR1, the DC-SIGN homologue in mice (Nagaoka *et al.*, 2005). Although the nature of the mincle ligand has not yet been characterized, this C-lectin also binds to yeast cell wall components and participates in the cell response with TLR-2 (Wells *et al.*, 2008). Galectin-3, a S-lectin originally described for its binding specificity for galactose, binds *Candida*-specific  $\beta$ -1,2 mannosides (Fradin *et al.*, 2000; Kohatsu *et al.*, 2006) and associates with TLR-2 when macrophages interact with yeasts (Jouault *et al.*, 2006). Finally, dectin-1 acts either



**Fig. 2.** Initial immune response which modulates the protection/invasion processes towards *C. albicans*. The figure shows the main immune system activities induced by *C. albicans* leading to either an inflammatory or anti-inflammatory response. The issue of colonization by the yeast will depend on the balance between these two responses, an amplified anti-inflammatory response induced by the yeast resulting in a disorder of the immune response that favours the development of infection.

alone (Brown, 2006; Rosas *et al.*, 2008) or with TLR-2 to confer cellular responsiveness to microbial  $\beta$ -glucans (Brown *et al.*, 2002; 2003; Gantner *et al.*, 2005).

A large number of yeast interactions with host cells have been characterized in different studies, and examination of host PRRs and *C. albicans* PAMPs has shed light on the interplay between these two organisms. All these studies reflect the complexity of this interaction, but it is now clear that the resultant signalling leads, in the majority of cases, to a pro-inflammatory response towards the yeast which has been described as necessary for acquiring resistance to infection. Notably, it is now accepted that both TLR-2 and TLR-4 are the main TLRs involved in the signalling induced by *C. albicans*, although, depending on the model used, conflicting results have been obtained (Netea *et al.*, 2002; Villamon *et al.*, 2004; Blasi *et al.*, 2005; Gil *et al.*, 2005; Gil and Gozalbo, 2006a,b). Nevertheless, this cell response does not seem to be specific to pathogenic microorganisms since, for example, *C. albicans* which is both commensal and pathogenic, and the non-pathogenic yeast *Saccharomyces cerevisiae* can both induce TLR-dependent pro-inflammatory cytokine production (Netea *et al.*, 2004b; Roeder *et al.*, 2004). The concept that, in contrast to *S. cerevisiae*, pathogenic *Candida* may interfere with regulation of the immune response at the cellular level has not been widely explored. It appears that an integrated immune response determines the lifelong commensalism of this yeast at the mucosal level, as well as transition from mucosal saprophyte to pathogen (Zelante *et al.*, 2007; Romani, 2008). However, several studies have indicated that an anti-inflammatory response during the initial interaction of yeasts with immune cells is necessary for the yeast to establish infection, showing that balancing the pro-/anti-inflammatory response is an important requisite for pathogenicity of candidiasis.

### The pro-/anti-inflammatory response, a balance between beneficial and deleterious effect of both microbe and host response

*Candida albicans* infection does not induce significant acute toxicity in IL-10-deficient mice (Del Sero *et al.*, 1999). Instead, improved clearance of yeasts, reduced fungal load and fungal-associated inflammatory responses are observed in IL-10 knockout (KO) mice, leading to early resistance to acute systemic candidiasis (Vazquez-Torres *et al.*, 1999). Conversely, in the gastrointestinal model of infection, exogenous IL-4 and IL-10 were found to exacerbate the course of infection (Tonnetti *et al.*, 1995), and an overall suppressive role of IL-10 on human monocyte function against *C. albicans* was also demonstrated (Roilides *et al.*, 1998). The absence of IL-10 therefore reinforces innate and acquired antifungal immunity. This allows upregulation of type 1 cytokine responses in particular, associated with greater production of IL-12 and TNF- $\alpha$  (Del Sero *et al.*, 1999).

These observations revealed a fundamental role for IL-10 in the initial development of *Candida* infection. This suggests that the yeast is able to play a role in stimulating the production of this cytokine during the initial processes and influence the pro-/anti-inflammatory cytokine balance that may then switch over the yeast from the commensal to the pathogenic state (Fig. 2). Such induced immunosuppression could therefore be a powerful immunoevasion strategy for the yeast (Romani and Puccetti, 2006).

Initial description of the role of TLRs in the cell response to *C. albicans* revealed that TLR-2 and TLR-4 were involved in the induction of pro-inflammatory cytokine production allowing protection of the host (Villamon *et al.*, 2004; Netea *et al.*, 2008). However, some data suggest that TLRs offer escape mechanisms to certain pathogenic microorganisms, especially through TLR-2-driven induc-

tion of anti-inflammatory cytokines, rendering the host response feeble. Indeed, it is surprising that, like IL-10 KO mice (Vazquez-Torres *et al.*, 1999), TLR-2 KO mice are more resistant to disseminated *Candida* infection (Netea *et al.*, 2004c). TLR-2 ( $-/-$ ) macrophages have increased candidacidal activity *in vitro*. *In vivo*, *C. albicans* induces immunosuppression through a TLR-2-derived signal that mediates increased IL-10 production and induction of regulatory T-cells (Netea *et al.*, 2004c). Such a link between TLR-2 and production of IL-10 (Kang *et al.*, 2004; Dillon *et al.*, 2006), as well as induction of regulatory T-cells (Sutmoller *et al.*, 2006), has been suggested. Macrophages are involved in regulation of the immune response through their ability to secrete large quantities of IL-10. They have also been shown to participate in suppression of the differentiation of Th1 and IL-17-producing T-helper cells, and promote the differentiation of Treg cells (Denning *et al.*, 2007). Thus, *C. albicans* may be able to induce both pro- and anti-inflammatory responses when recognized by macrophages, both responses originating from an interaction that seems to depend on TLR-2.

#### Regulation of an adequate or inadequate response: the role of some PAMPs

The most potent stimuli of macrophages have been demonstrated to be glyco-conjugated components such as mannans (Tada *et al.*, 2002), including  $\beta$ -1,2 oligomannoses (Jouault *et al.*, 1995), phospholipomannan (PLM) (Jouault *et al.*, 2003) and  $\beta$ -glucans (Brown *et al.*, 2003). Mannans are found in part of the cell wall directly available at the surface of yeasts. However, this complex structure is not specific to *C. albicans* since it is a basic entity present on all yeasts (*C. albicans* and *S. cerevisiae*), whether they are pathogenic or not. However, on *C. albicans*, some unique mannosides, namely  $\beta$ -1,2-linked mannosides, have been described to act as stimuli for macrophages (Jouault *et al.*, 1995; 2000). Unlike these mannans,  $\beta$ -glucans, which are part of the backbone of all yeasts, are not accessible directly to the immune cells.  $\beta$ -Glucans are available on blastoconidia, mainly after treatment that opens up the deepest cell wall components, such as heat treatment (Martinez-Esparza *et al.*, 2006). Exposure of  $\beta$ -glucans, which may reflect the partial degradation of the yeast cell wall within phagosomes and the loss of the superficial cell wall layer (Gantner *et al.*, 2005; Martinez-Esparza *et al.*, 2006), may allow their presentation to specific PRRs, such as dectin-1.  $\beta$ -Glucans are also soluble and can be detected, like mannan components (either  $\alpha$ - or  $\beta$ -1,2-linked mannose residues), in patients' sera, rendering them available as soluble stimuli for immune cells (Sendid *et al.*, 2004; Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2005).  $\beta$ -1,2-Linked mannosides are specifically exposed at the surface of

*C. albicans* (Kobayashi *et al.*, 1992). However, the glycolipid PLM, which is located within the yeast cell wall and is accessible at the surface (Poulain *et al.*, 2002), is shed by *C. albicans*, allowing direct contact with the host cells even in the absence of phagocytosis (Jouault *et al.*, 1998).  $\beta$ -1,2-Linked mannosides (Jouault *et al.*, 1995) and PLM (Jouault *et al.*, 1994) induce a pro-inflammatory response that depends mainly on TLR-2 (Jouault *et al.*, 2003). Structural analysis has shown that PLM is a mannose inositol phospho ceramide (MIPC), thereby presenting two moieties which can induce opposite effects on target cells (Trinel *et al.*, 2002): a glycan component composed of up to 14  $\beta$ -1,2-linked mannosides, identical to that present in the acid-labile part of O-linked mannan, acting as signals for TNF- $\alpha$  stimulation (Jouault *et al.*, 1995) and recognized by galectin-3 (Fradin *et al.*, 2000; Kohatsu *et al.*, 2006) in association with TLR-2 (Jouault *et al.*, 2006), and a lipid moiety whose role is less well defined. However, through this latter moiety, PLM may act as a negative regulator of the cell response through activation of MKP-1 (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003a), a phosphatase that is involved in the regulation of pro- and anti-inflammatory responses (Chi *et al.*, 2006). This leads to inactivation of ERK-1 phosphorylation (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003b), which is necessary for the efficient killing of *Candida* (Ibata-Ombetta *et al.*, 2001; Wozniok *et al.*, 2008) and which is involved in the activation of several downstream targets including p90RSK and BAD, which are involved in mitochondrial apoptosis of cells (Ibata-Ombetta *et al.*, 2003a,b). Interestingly, recent data show that inhibition of MNK, a Mapk downstream of ERK-1, blocked the pro-inflammatory response but permitted IL-10 production in response to TLR stimulation (Rowlett *et al.*, 2008), an effect that has been observed when large amounts of yeasts expressing PLM are in contact with macrophages (A. Sarazin, personal communication). In addition, control of TNF- $\alpha$  mRNA nuclear export has been shown to operate specifically through ERK-1 (Skinner *et al.*, 2008), TNF- $\alpha$  mRNA being trapped in the nucleus when ERK-1 is inactive (Dumitru *et al.*, 2000). Together, these observations suggest a central role for ERK-1 activation in the regulation of TNF- $\alpha$  production, either positive or negative, which could depend on the yeast burden, and efficient killing of yeasts. However, the exact participation of Mapks and upstream adaptors in the direction of cytokines produced in response to yeasts has not yet been clearly established.

#### Role of Mapks and mediators in regulation

Members within one family of PRRs can trigger opposite signalling effects, indicating that the ultimate outcome of a pathogen-induced immune response depends on the pathogen signature and the PRRs involved. This may lead to the recruitment of different adaptors and Mapks accord-

ing to the PRRs and PAMPs involved. Slack *et al.* (2007) showed that induction of IL-10 by zymosan, a yeast cell wall derivative, requires activation of ERK depending on recruitment of Syk but not involving MyD88, the well-characterized TLR-2 adaptor participating in TNF- $\alpha$  induction. Conversely, induction of IL-10 by *Streptococcus pneumoniae* cell wall fragments also requires TLR-2 and participation of both MyD88 and NOD2, but is independent of ERK activation (Moreira *et al.*, 2008). More recently, evidence has been obtained for the role of Raf-1-dependent acetylation of NF $\kappa$ B in the modulation by DC-SIGN of TLR-dependent signalling, leading to both prolonged and increased IL-10 transcription (Gringhuis *et al.*, 2007). Interestingly, a link between ligation of TLRs and subsequent activation of ERK and NF $\kappa$ B signalling pathways has been observed through engagement of Tpl2, a Mapk upstream of ERK, that is involved downstream of TLR-dependent signalling (Banerjee *et al.*, 2006), and Syk-dependent activation (Eliopoulos *et al.*, 2006). Alternatively, a signalling pathway can be initiated by dectin-1 independently of TLR but involving CARD9 to link dectin-1/Syk to NF $\kappa$ B activation through Bcl10 and Malt1 for innate antifungal immunity (Gross *et al.*, 2006; LeibundGut-Landmann *et al.*, 2007).

#### Relation between phagocytosis and signalling

Beside, or in association with, their role in signalling, PRRs are also involved in the recognition and phagocytosis of pathogens. However, few studies have concerned this part of their biological activity and their role in the antimicrobial activity of innate immune cells has not been clearly established. Lectins are engaged in phagocytosis and some have been demonstrated to facilitate this process (Cambi *et al.*, 2003; Porcaro *et al.*, 2003; Sano *et al.*, 2003). This has been well studied for mannose-binding lectin (MBL) which eliminates potential pathogens by activating the lectin pathway of complement or by opsonization of invading microorganisms (Turner and Hamvas, 2000). However, with certain lectins the mechanism of phagocytosis differs from other more conventional processes. Dectin-1-mediated phagocytosis depends on its ITAM-like motif but is Syk-independent. This involves different mediators such as Rac-1 and Cdc42, but not Rho, making the mechanism different from that used by FcR (Herre *et al.*, 2004). Similarly, peritoneal macrophages from galectin-3 KO mice showed attenuated phagocytic clearance of apoptotic thymocytes and reduced IgG-mediated phagocytosis of opsonized erythrocytes (Sano *et al.*, 2003). However, galectin-3, which associates with *C. albicans* within the phagosomes and delivers specific signals, does not interfere with the efficiency of yeast phagocytosis (Jouault *et al.*, 2006). Although controversial according to the ligand examined (Yates and

Russell, 2005; Russell and Yates, 2007), at least for bacteria, TLRs have also been shown to be involved in activation of the TLR signalling pathway regulating phagocytosis at the level of internalization and phagosome maturation (Blander and Medzhitov, 2004; Underhill and Gantner, 2004; Blander, 2007), with subsequent enhancement of actin-cytoskeleton mobilization that facilitates antigen processing and presentation (Blander and Medzhitov, 2006). Interestingly, TLRs engaged during phagocytosis of microbial pathogens by dendritic cells, but not syngeneic apoptotic cells, control both phagosome kinetics and maturation, with individual phagosomes undergoing separate programmes of maturation (Blander, 2007).

The link between recognition of microbes through PAMPs, their phagocytosis, and subsequent induction of signalling is not well established. Indeed, it has not been determined whether efficient signalling induced by whole microbes requires phagocytosis or not. The reason for this lack of data may be due to the multiplicity of PAMPs available at the surface of microbes and the multiplicity of PRRs possibly involved in recognition and signalling. Thus, most studies have been conducted using soluble PAMPs or particulates. In a recent study (Rosas *et al.*, 2008), it was demonstrated that depending on the nature of the  $\beta$ -glucans and the size of the particulates, either ligation of dectin-1 at the cell membrane was sufficient to induce a pro-inflammatory response through the Syk/CARD9 pathway, or, in the context of 'frustrated' phagocytosis, increased expression of TLR was induced, favouring a different signalling pathway also ending with a pro-inflammatory response.

#### Human response and PRR-PAMP interaction: assistance of SNPs

As a result of what is observed in KO mice, several PRRs have been explored for single-nucleotide polymorphisms (SNPs), with the aim of finding a link between observations in animal models and human reality. On the basis that SNPs in humans may reflect KO mice models, investigations have pointed to the role of several receptors in the cellular response to yeasts. Although these studies are relatively recent, some have indeed demonstrated a role of TLRs and other PRRs in human candidiasis, demonstrating the relevance of *in vitro* and *in vivo* studies. SNPs affecting TLR-2 responsiveness have revealed that these receptors contribute to the course of sepsis, which is associated with substantial morbidity and mortality during intensive care treatment. In this respect, the TLR-2 SNP Arg753Gln results in altered cytokine release in response to *Candida* but not to Gram-positive sepsis. In contrast, in *Candida* sepsis, Arg753Gln heterozygous patients showed biomarker patterns that differed from wild-type patients with elevated TNF- $\alpha$  plasma concentra-

tions, but reduced IFN- $\gamma$  and IL-8 levels (Woehrlé *et al.*, 2008). For TLR-4, Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms have been shown to be associated with an increased susceptibility to *Candida* bloodstream infections. This may lead to increased production of IL-10, probably initiating the observed effect (Van der Graaf *et al.*, 2006). Consistent with evidence that pathogens can utilize DC-SIGN binding to suppress the pro-inflammatory response, SNP Ala336Gly has been shown to decrease DC-SIGN expression and to be associated with lower susceptibility of humans to different pathogens (Vannberg *et al.*, 2008). Recent advances in galectin-3 SNP analysis have demonstrated a new alteration that affects the capability of individuals to develop a secondary humoral response specific to glycans, a tag for the initial sensing of *Candida* by the immune system (A. Sarazin, personal communication) which makes TLRs and thus, associated lectins, important for the secondary response to yeasts. Both PRRs and associated lectin receptors seem to be important for the definitive response against infection. Thus, a link can be made between laboratory observations and patient behaviour. However, much more information is needed to understand the complex interplay required for the development of an immune response.

### Conclusion

This brief review highlights the complex signalling leading to antagonistic pro- or anti-inflammatory responses, based on the recruitment of different PRRs (either TLRs or lectins) able to recruit cytoplasmic transmitters, depending on multiple ligands exposed on microorganisms such as *C. albicans*. Better understanding of the pathophysiology of such 'patho-commensal' microorganisms lies in the study of the early steps of the interplay which conditions the nature of the recruited transmitter. This model clearly shows that the interplay among innate signals and shaping of the adaptive response is the concerted action of many components that influence each other. TLRs may interfere with antigen processing and presentation regulated by lectins, whereas, in turn, lectins as antigen uptake receptors influence signalling pathways initiated by TLRs. The ultimate outcome is dictated by the pathogen's PAMPs (glycans and TLR agonists) which determine the set of receptors involved in shaping the immune repertoire of cells. What makes pathogens like *C. albicans* successful is their ability to rapidly modulate their PAMPs. In this respect, much is still unknown about the impact of cell wall molecules exposed on the yeast as a function of host environment, on the numerous receptors and signalling pathways leading to either beneficial or deleterious responses. The use of live *in vitro* methods enabling us to follow the sequence of events actually induced, instead of time-point examination, would be of

great value in increasing our understanding of this complex dynamic process.

### Acknowledgements

This work was supported in part by the European Community-Feder fund, Région Nord-Pas de Calais, ANR and Inserm. Aurore Sarazin was supported by a grant from Inserm/Région Nord-Pas de Calais.

### References

- Banerjee, A., Gugasyan, R., McMahon, M., and Gerondakis, S. (2006) Diverse Toll-like receptors utilize Tpl2 to activate extracellular signal-regulated kinase (ERK) in hemopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 3274–3279.
- Blander, J.M. (2007) Signalling and phagocytosis in the orchestration of host defence. *Cell Microbiol* **9**: 290–299.
- Blander, J.M., and Medzhitov, R. (2004) Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* **304**: 1014–1018.
- Blander, J.M., and Medzhitov, R. (2006) Toll-dependent selection of microbial antigens for presentation by dendritic cells. *Nature* **440**: 808–812.
- Blasi, E., Mucci, A., Neglia, R., Pezzini, F., Colombari, B., Radzioch, D., *et al.* (2005) Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**: 69–79.
- Brown, G.D. (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* **6**: 33–43.
- Brown, G.D., Taylor, P.R., Reid, D.M., Willment, J.A., Williams, D.L., Martinez-Pomares, L., *et al.* (2002) Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J Exp Med* **196**: 407–412.
- Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S., and Gordon, S. (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of [beta]-glucans. *J Exp Med* **197**: 1119–1124.
- Calderone, R. (2002) *Candida and Candidiasis*. Washington, DC: ASM Press.
- Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J.M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G.J., *et al.* (2003) The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* **33**: 532–538.
- Chi, H., Barry, S.P., Roth, R.J., Wu, J.J., Jones, E.A., Bennett, A.M., and Flavell, R.A. (2006) Dynamic regulation of pro- and anti-inflammatory cytokines by MAPK phosphatase 1 (MKP-1) in innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 2274–2279.
- Del Sero, G., Mencacci, A., Cenci, E., d'Ostiani, C.F., Montagnoli, C., Bacci, A., *et al.* (1999) Antifungal type 1 responses are upregulated in IL-10-deficient mice. *Microbes Infect* **1**: 1169–1180.
- Denning, T.L., Wang, Y.C., Patel, S.R., Williams, I.R., and Pulendran, B. (2007) Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* **8**: 1086–1094.
- Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T.L., Oswald-Richter, K., *et al.* (2006) Yeast zymosan, a

- stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest* **116**: 916–928.
- Dumitru, C.D., Ceci, J.D., Tsatsanis, C., Kontoyiannis, D., Stamatakis, K., Lin, J.H., *et al.* (2000) TNF- $\alpha$  induction by LPS is regulated posttranscriptionally via a Tpl2/ERK-dependent pathway. *Cell* **103**: 1071–1083.
- Eliopoulos, A.G., Das, S., and Tschlis, P.N. (2006) The tyrosine kinase Syk regulates TPL2 activation signals. *J Biol Chem* **281**: 1371–1380.
- Fradin, C., Jouault, T., Mallet, A., Mallet, J.M., Camus, D., Sinay, P., and Poulain, D. (1996) Beta-1,2-linked oligomannosides inhibit *Candida albicans* binding to murine macrophage. *J Leukoc Biol* **60**: 81–87.
- Fradin, C., Poulain, D., and Jouault, T. (2000) Beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun* **68**: 4391–4398.
- Gantner, B.N., Simmons, R.M., and Underhill, D.M. (2005) Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J* **24**: 1277–1286.
- Gil, M.L., and Gozalbo, D. (2006a) About the role of TLR2 and TLR4 in cytokine secretion by murine macrophages in response to *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**: 1–2.
- Gil, M.L., and Gozalbo, D. (2006b) TLR2, but not TLR4, triggers cytokine production by murine cells in response to *Candida albicans* yeasts and hyphae. *Microbes Infect* **8**: 2299–2304.
- Gil, M.L., Fradelizi, D., and Gozalbo, D. (2005) TLR2: for or against *Candida albicans*? *Trends Microbiol* **13**: 298–299.
- Gringhuis, S.I., den Dunnen, J., Litjens, M., van Het Hof, B., van Kooyk, Y., and Geijtenbeek, T.B. (2007) C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF- $\kappa$ B. *Immunity* **26**: 605–616.
- Gross, O., Gewies, A., Finger, K., Schafer, M., Sparwasser, T., Peschel, C., *et al.* (2006) Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **442**: 651–656.
- Herre, J., Marshall, A.S., Caron, E., Edwards, A.D., Williams, D.L., Schweighoffer, E., *et al.* (2004) Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* **104**: 4038–4045.
- Ibata-Ombetta, S., Jouault, T., Trinel, P.A., and Poulain, D. (2001) Role of extracellular signal-regulated protein kinase cascade in macrophage killing of *Candida albicans*. *J Leukoc Biol* **70**: 149–154.
- Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P., Poulain, D., and Jouault, T. (2003a) Role of phospholipomannan in *Candida albicans* escape from macrophages and induction of cell apoptosis through regulation of Bad phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* **1010**: 573–576.
- Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P.A., Poulain, D., and Jouault, T. (2003b) *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 13086–13093.
- Jouault, T., Bernigaud, A., Lepage, G., Trinel, P.A., and Poulain, D. (1994) The *Candida albicans* phospholipomannan induces *in vitro* production of tumour necrosis factor- $\alpha$  from human and murine macrophages. *Immunology* **83**: 268–273.
- Jouault, T., Lepage, G., Bernigaud, A., Trinel, P.A., Fradin, C., Wieruszkeski, J.M., *et al.* (1995) Beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* act as signals for tumor necrosis factor  $\alpha$  production. *Infect Immun* **63**: 2378–2381.
- Jouault, T., Fradin, C., Trinel, P.A., Bernigaud, A., and Poulain, D. (1998) Early signal transduction induced by *Candida albicans* in macrophages through shedding of a glycolipid. *J Infect Dis* **178**: 792–802.
- Jouault, T., Fradin, C., Trinel, P.A., and Poulain, D. (2000) *Candida albicans*-derived beta-1,2-linked manno-oligosaccharides induce desensitization of macrophages. *Infect Immun* **68**: 965–968.
- Jouault, T., Ibata-Ombetta, S., Takeuchi, O., Trinel, P., Sacchetti, P., Lefebvre, P., *et al.* (2003) *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through Toll-like receptors. *J Infect Dis* **188**: 165–172.
- Jouault, T., El Abed-El Behi, M., Martinez-Esparza, M., Breuilh, L., Trinel, P.A., Chamillard, M., *et al.* (2006) Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol* **177**: 4679–4687.
- Kang, T.J., Yeum, C.E., Kim, B.C., You, E.Y., and Chae, G.T. (2004) Differential production of interleukin-10 and interleukin-12 in mononuclear cells from leprosy patients with a Toll-like receptor 2 mutation. *Immunology* **112**: 674–680.
- Kobayashi, H., Shibata, N., and Suzuki, S. (1992) Evidence for oligomannosyl residues containing both beta-1,2 and alpha-1,2 linkages as a serotype A-specific epitope(s) in mannans of *Candida albicans*. *Infect Immun* **60**: 2106–2109.
- Kohatsu, L., Hsu, D.K., Jegalian, A.G., Liu, F.T., and Baum, L.G. (2006) Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol* **177**: 4718–4726.
- LeibundGut-Landmann, S., Gross, O., Robinson, M.J., Osorio, F., Slack, E.C., Tsoni, S.V., *et al.* (2007) Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* **8**: 630–638.
- McGreal, E.P., Rosas, M., Brown, G.D., Zamze, S., Wong, S.Y., Gordon, S., *et al.* (2006) The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology* **16**: 422–430.
- Martinez-Esparza, M., Sarazin, A., Jouy, N., Poulain, D., and Jouault, T. (2006) Comparative analysis of cell wall surface glycan expression in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts by flow cytometry. *J Immunol Methods* **314**: 90–102.
- Moreira, L.O., El Kasmi, K.C., Smith, A.M., Finkelstein, D., Fillon, S., Kim, Y.G., *et al.* (2008) The TLR2-MyD88-NOD2-RIPK2 signalling axis regulates a balanced pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory cytokine response to Gram-positive cell walls. *Cell Microbiol* **10**: 2067–2077.
- Mukhopadhyay, S., Herre, J., Brown, G.D., and Gordon, S.

- (2004) The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors. *Immunology* **112**: 521–530.
- Nagaoka, K., Takahara, K., Tanaka, K., Yoshida, H., Steinman, R.M., Saitoh, S., et al. (2005) Association of SIGIRR1 with TLR4-MD-2 enhances signal transduction by recognition of LPS in gram-negative bacteria. *Int Immunol* **17**: 827–836.
- Netea, M., Van der Graaf, C., Vonk, A., Verschuere, I., Van der Meer, J., and Kullberg, B. (2002) The role of Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated Candidiasis. *J Infect Dis* **185**: 1483–1489.
- Netea, M.G., Van Der Graaf, C., Van Der Meer, J.W., and Kullberg, B.J. (2004a) Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**: 672–676.
- Netea, M.G., van der Graaf, C., Van der Meer, J.W., and Kullberg, B.J. (2004b) Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol* **75**: 749–755.
- Netea, M.G., Suttmüller, R., Hermann, C., Van der Graaf, C.A., Van der Meer, J.W., van Krieken, J.H., et al. (2004c) Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* **172**: 3712–3718.
- Netea, M.G., Gow, N.A., Munro, C.A., Bates, S., Collins, C., Ferwerda, G., et al. (2006) Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* **116**: 1642–1650.
- Netea, M.G., Brown, G.D., Kullberg, B.J., and Gow, N.A. (2008) An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* **6**: 67–78.
- Ostrosky-Zeichner, L., Alexander, B.D., Kett, D.H., Vazquez, J., Pappas, P.G., Saeki, F., et al. (2005) Multicenter clinical evaluation of the (1→3) beta-D-glucan assay as an aid to diagnosis of fungal infections in humans. *Clin Infect Dis* **41**: 654–659.
- Pietrella, D., Bistoni, G., Corbucci, C., Perito, S., and Vecchiarelli, A. (2006) *Candida albicans* mannoprotein influences the biological function of dendritic cells. *Cell Microbiol* **8**: 602–612.
- Porcaro, I., Vidal, M., Jouvert, S., Stahl, P.D., and Giaimis, J. (2003) Mannose receptor contribution to *Candida albicans* phagocytosis by murine E-clone J774 macrophages. *J Leukoc Biol* **74**: 206–215.
- Poulain, D., and Jouault, T. (2004) *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol* **7**: 342–349.
- Poulain, D., Slomianny, C., Jouault, T., Gomez, J.M., and Trinell, P.A. (2002) Contribution of phospholipomannan to the surface expression of beta-1,2-oligomannosides in *Candida albicans* and its presence in cell wall extracts. *Infect Immun* **70**: 4323–4328.
- Roeder, A., Kirschning, C.J., Rupec, R.A., Schaller, M., Weindl, G., and Korting, H.C. (2004) Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol* **42**: 485–498.
- Roilides, E., Anastasiou-Katsiardani, A., Dimitriadou-Georgiadou, A., Kaditsoglou, I., Tsaparidou, S., Pantelias, C., and Walsh, T.J. (1998) Suppressive effects of interleukin-10 on human mononuclear phagocyte function against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* **178**: 1734–1742.
- Romani, L. (2008) Cell mediated immunity to fungi: a reassessment. *Med Mycol* **46**: 515–529.
- Romani, L., and Puccetti, P. (2006) Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol* **14**: 183–189.
- Rosas, M., Liddiard, K., Kimberg, M., Faro-Trindade, I., McDonald, J.U., Williams, D.L., et al. (2008) The induction of inflammation by dectin-1 *in vivo* is dependent on myeloid cell programming and the progression of phagocytosis. *J Immunol* **181**: 3549–3557.
- Rowlett, R.M., Chrestensen, C.A., Nyce, M., Harp, M.G., Pelo, J.W., Cominelli, F., et al. (2008) MNK kinases regulate multiple TLR pathways and innate proinflammatory cytokines in macrophages. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**: 452–459.
- Russell, D.G., and Yates, R.M. (2007) TLR signalling and phagosome maturation: an alternative viewpoint. *Cell Microbiol* **9**: 849–850.
- Sano, H., Hsu, D.K., Apgar, J.R., Yu, L., Sharma, B.B., Kuwabara, I., et al. (2003) Critical role of galectin-3 in phagocytosis by macrophages. *J Clin Invest* **112**: 389–397.
- Sato, K., Yang, X.L., Yudate, T., Chung, J.S., Wu, J., Luby-Phelps, K., et al. (2006) 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* **281**: 38854–38866.
- Sendid, B., Jouault, T., Coudriau, R., Camus, D., Odds, F., Tabouret, M., and Poulain, D. (2004) Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of alpha- and beta-linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* **42**: 164–171.
- Skinner, S.J., Deleault, K.M., Fecteau, R., and Brooks, S.A. (2008) Extracellular signal-regulated kinase regulation of tumor necrosis factor-alpha mRNA nucleocytoplasmic transport requires TAP/Nxt1 binding and the AU-Rich element. *J Biol Chem* **283**: 3191–3199.
- Slack, E.C., Robinson, M.J., Hernandez-Falcon, P., Brown, G.D., Williams, D.L., Schweighoffer, E., et al. (2007) Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan. *Eur J Immunol* **37**: 1600–1612.
- Stahl, P.D., and Ezekowitz, R.A. (1998) The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* **10**: 50–55.
- Suttmüller, R.P., den Brok, M.H., Kramer, M., Bennink, E.J., Toonen, L.W., Kullberg, B.J., et al. (2006) Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* **116**: 485–494.
- Tachado, S.D., Zhang, J., Zhu, J., Patel, N., Cushion, M., and Koziel, H. (2007) Pneumocystis-mediated IL-8 release by macrophages requires coexpression of mannose receptors and TLR2. *J Leukoc Biol* **81**: 205–211.
- Tada, H., Nemoto, E., Shimauchi, H., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T., et al. (2002) *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* **46**: 503–512.
- Taylor, P.R., Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., and Gordon, S. (2004) The role of SIGIRR1 and the beta-glucan receptor (Dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. *J Immunol* **172**: 1157–1162.
- Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2005) Macrophage receptors and immune recognition. *Annu Rev Immunol* **23**: 901–944.
- Tonnetti, L., Spaccapelo, R., Cenci, E., Mencacci, A., Puccetti, P., Coffman, R.L., *et al.* (1995) Interleukin-4 and -10 exacerbate candidiasis in mice. *Eur J Immunol* **25**: 1559–1565.
- Trinel, P.A., Maes, E., Zanetta, J.P., Delplace, F., Coddeville, B., Jouault, T., *et al.* (2002) *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *J Biol Chem* **277**: 37260–37271.
- Turner, M.W., and Hamvas, R.M. (2000) Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Rev Immunogenet* **2**: 305–322.
- Underhill, D.M., and Gantner, B. (2004) Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity. *Microbes Infect* **6**: 1368–1373.
- Van der Graaf, C.A., Netea, M.G., Morre, S.A., Den Heijer, M., Verweij, P.E., Van der Meer, J.W., and Kullberg, B.J. (2006) Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for *Candida* bloodstream infection. *Eur Cytokine Netw* **17**: 29–34.
- Vannberg, F.O., Chapman, S.J., Khor, C.C., Tosh, K., Floyd, S., Jackson-Sillah, D., *et al.* (2008) CD209 genetic polymorphism and tuberculosis disease. *PLoS ONE* **3**: e1388.
- Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Wagner, R.D., Warner, T., and Balish, E. (1999) Early resistance of interleukin-10 knockout mice to acute systemic candidiasis. *Infect Immun* **67**: 670–674.
- Villamon, E., Gozalbo, D., Roig, P., O'Connor, J.E., Fradelizi, D., and Gil, M.L. (2004) Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect* **6**: 1–7.
- Wells, C.A., Salvage-Jones, J.A., Li, X., Hitchens, K., Butcher, S., Murray, R.Z., *et al.* (2008) The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. *J Immunol* **180**: 7404–7413.
- Woehrle, T., Du, W., Goetz, A., Hsu, H.Y., Joos, T.O., Weiss, M., *et al.* (2008) Pathogen specific cytokine release reveals an effect of TLR2 Arg753Gln during *Candida* sepsis in humans. *Cytokine* **1**: 322–329.
- Wozniok, I., Hornbach, A., Schmitt, C., Frosch, M., Einsele, H., Hube, B., *et al.* (2008) Induction of ERK-kinase signaling triggers morphotype-specific killing of *Candida albicans* filaments by human neutrophils. *Cell Microbiol* **10**: 807–820.
- Yates, R.M., and Russell, D.G. (2005) Phagosome maturation proceeds independently of stimulation of toll-like receptors 2 and 4. *Immunity* **23**: 409–417.
- Zelante, T., Montagnoli, C., Bozza, S., Gaziano, R., Bellochio, S., Bonifazi, P., *et al.* (2007) Receptors and pathways in innate antifungal immunity: the implication for tolerance and immunity to fungi. *Adv Exp Med Biol* **590**: 209–221.

## **RESULTATS**

## RESULTATS

### I. Mise au point d'une méthode d'évaluation qualitative et quantitative de l'expression des glycanes pariétaux de levures (article 2 et 3)

#### A. Mise au point de la méthode de cytométrie

Les glycanes de la paroi de *C. albicans* jouent un rôle important dans les interactions avec les cellules de l'hôte et contribuent ainsi à l'équilibre commensal-pathogène. Certains de ces glycanes pariétaux sont exprimés à la fois par *C. albicans* et par *S. cerevisiae*, suggérant que les mécanismes moléculaires de reconnaissance mis en jeu par les récepteurs macrophagiques sont similaires.

L'objectif de cette étude a été le développement de la technique de cytométrie en flux appliquée à la levure afin d'analyser le rôle relatif des glycanes de paroi dans l'interaction avec les cellules macrophagiques. La présence et l'accessibilité des glycanes en surface de *C. albicans* et de *S. cerevisiae* ont été évaluées par cet outil et comparées en fonction des différentes conditions de culture.

Les anticorps polyclonaux de lapin spécifiquement dirigés contre les glycanes pariétaux de *Candida*, conçus par les laboratoires Iatron et développés pour l'identification des différentes espèces de *Candida* en test d'agglutination, ont été adaptés à cette technique. L'utilisation de ces facteurs antigéniques jointe à celle d'anticorps spécifiques des glycanes pariétaux a permis la caractérisation et la quantification du profil d'expression des glycanes de la paroi de levures en cytométrie de flux. Les résultats obtenus, en accord avec les données obtenues avec d'autres méthodes, (Trinel, *et al.*, 2002) ont permis de valider la méthode de phénotypage des levures par le FACS. L'expression glycanique de surface de *C. albicans* et *S. cerevisiae*, a pu être analysée en fonction des conditions de culture. Des différences d'expression glycanique de surface des  $\alpha$  et des  $\beta$ -mannosides ont été observées.

Les données indiquent que les  $\beta$ -mannosides exposés sur les mannoprotéines et/ou le phospholipomannane sont augmentés en phase stationnaire alors que ceux liés au mannane ne sont pas affectés par les différentes conditions de culture. Ainsi, la technique de cytométrie en flux est une méthode efficace pour étudier la modulation de l'expression glycanique de surface de *C. albicans* en fonction des conditions environnementales.

## **ARTICLE 2**

Comparative analysis of cell wall surface glycan expression  
in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*  
yeasts by flow cytometry

Research paper

## Comparative analysis of cell wall surface glycan expression in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts by flow cytometry

M. Martínez-Esparza<sup>a,\*</sup>, A. Sarazin<sup>b</sup>, N. Jouy<sup>c</sup>, D. Poulain<sup>b</sup>, T. Jouault<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Bioquímica y Biología Molecular (B) e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Murcia, Campus de Espinardo, 30100 Murcia, Spain

<sup>b</sup> Inserm U799; Laboratoire de Mycologie Fondamentale et Appliquée, Université de Lille II, Lille, France

<sup>c</sup> Inserm IFRI14; Service de Cytométrie, Institut de Recherche sur le Cancer de Lille, Lille, France

Received 27 January 2006; received in revised form 21 May 2006; accepted 7 June 2006  
Available online 7 July 2006

### Abstract

The yeast *Candida albicans* is an opportunistic pathogen, part of the normal human microbial flora that causes infections in immunocompromised individuals with a high morbidity and mortality levels. Recognition of yeasts by host cells is based on components of the yeast cell wall, which are considered part of its virulence attributes. Cell wall glycans play an important role in the continuous interchange that regulates the balance between saprophytism and parasitism, and also between resistance and infection. Some of these molecular entities are expressed both by the pathogenic yeast *C. albicans* and by *Saccharomyces cerevisiae*, a related non-pathogenic yeast, involving similar molecular mechanisms and receptors for recognition. In this work we have exploited flow cytometry methods for probing surface glycans of the yeasts. We compared glycan expression by *C. albicans* and by *S. cerevisiae*, and studied the effect of culture conditions. Our results show that the expression levels of  $\alpha$ - and  $\beta$ -linked mannosides as well as  $\beta$ -glucans can be successfully evaluated by flow cytometry methods using different antibodies independent of agglutination reactions. We also found that the surface expression pattern of  $\beta$ -mannosides detected by monoclonal or polyclonal antibodies are differently modulated during the growth course. These data indicate that the yeast  $\beta$ -mannosides exposed on mannoproteins and/or phospholipomannan are increased in stationary phase, whereas those linked to mannan are not affected by the yeast growth phase. The cytometric method described here represents a useful tool to investigate to what extent *C. albicans* is able to regulate its glycan surface expression and therefore modify its virulence properties.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

**Keywords:** *Candida albicans*; Surface markers; Virulence factors; Glycans; Agglutination; Cell wall

### 1. Introduction

The yeast *Candida albicans* is an opportunistic pathogen, part of the normal human microbial flora. The high morbidity and mortality levels induced by *C. albicans* in immunocompromised individuals, such as patients with AIDS, subjected to transplantation, aggressive

**Abbreviations:** mAb, monoclonal antibody; pAb, polyclonal antibody; PLM, phospholipomannan.

\* Corresponding author. Tel.: +34 968 363960; fax: +34 968 830950.

E-mail address: maria@um.es (M. Martínez-Esparza).

0022-1759/\$ - see front matter © 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.  
doi:10.1016/j.jim.2006.06.004

surgery, or prolonged chemotherapy (Calderone, 2002) mean that this yeast is now one of the most prominent human pathogens.

Progress have been made in the elucidation of *C. albicans* characteristics linked to switching, dimorphism, adhesion, and enzyme secretion that could explain the mechanism by which this commensal fungus can become an opportunistic pathogen (Calderone and Fonzi, 2001). However, the mechanisms that direct host susceptibility or resistance to *C. albicans* infection are as yet unclear, and extensive current research concerns *C. albicans* molecules interacting with the host immune system.

Recognition of yeasts by host cells is based on components of the yeasts cell wall, which is a complex structure composed mainly of glycans. The outermost layers of the cell wall are made of phosphopeptidomannan, a polymer of O- and N-linked mannose residues commonly referred to as mannan. The O-linked mannose residues consist of short chains of  $\alpha$ -1,2- and  $\alpha$ -1,3-linked mannose. The N-linked part (see Fig. 1) consists of a backbone of  $\alpha$ -1,6-linked mannopyranose residues with branches composed of  $\alpha$ -1,2- and  $\alpha$ -1,3-linked mannopyranose units. N-linked mannan can be resolved by mild acid hydrolysis into an acid-stable fraction, consisting of all proximal mannose residues, and an acid-labile fraction which corresponds in *Candida*, to phosphomannan mainly made of  $\beta$ -1,2-linked mannose chains (Shibata et al., 1991). In *C. albicans*, additional linked  $\beta$ -1,2 mannosides are present as terminal mannosides of acid-stable fraction side chains and constitute the *C. albicans* serotype A (Shibata et al., 1985; Kobayashi et al., 1992). Despite some differences in chain length and antigenicity,

$\alpha$ -linked mannosides are considered as similar in both *C. albicans* and the genetically-related but non-pathogenic yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In contrast, the unusual  $\beta$ -1,2 type of linkage is specific for *Candida* species and confers a unique stereospecificity to *C. albicans* (Nitz et al., 2002).  $\beta$ -1,2 mannosides are also associated with other carrier molecules such as mannoproteins (Cantelli et al., 1995) and a glycolipid, the phospholipomannan (PLM), which is specifically expressed by some strains of *Candida* and consists of a ceramide core attached by a unique mannosylphosphate/manno-inositol phosphate spacer to an unbranched  $\beta$ -1,2-oligomannoside chain of up to 19 residues (Trinel et al., 2002). PLM which is present within the cell wall, has been shown to participate in  $\beta$ -1,2 mannoside expression attributed to mannan (Poulain et al., 2002). It has also been shown to be shed by *C. albicans* in contact with host cells (Jouault et al., 1998; Dalle et al., 2003).

The serological classification of Tsuchiya et al. (1974), resulting from the serological study on a variety of yeasts based on their agglutination abilities with a series of rabbit polyclonal antibodies (Iatron kit), has permitted the description of 10 antigenic factors more or less specific for the different strains of *Candida*. These factors have been used as a tool to identify medically important *Candida* species in clinical specimens. Immunochemical investigations, that have been carried out together with structural analysis of mannan from different strains of the genus *Candida* have resulted in major findings regarding the epitopic structural determination of those antigenic factors (Suzuki, 1997). Among them, antigenic factor 5 comprises the homopolymers of  $\beta$ -1,2-linked mannose

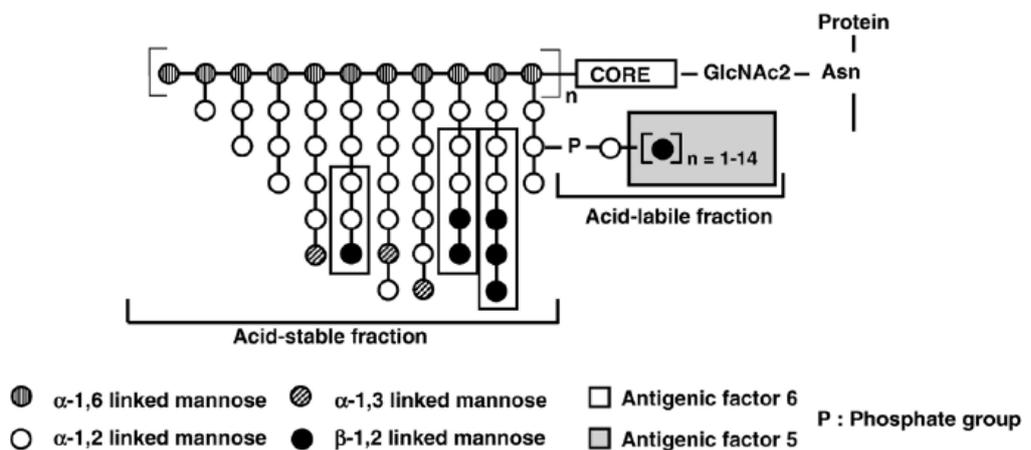


Fig. 1. Structure of *C. albicans* N-linked mannan. The Man core group is attached to protein through two *N*-acetyl-glucosamine residues (GlcNAc<sub>2</sub>). The acid-stable fraction consists of the outer chain with  $\alpha$ -1,2- and  $\alpha$ -1,3-linked oligomannoside branches. The acid-labile fraction is linked to the acid-stable oligomannosides by a phosphodiester bond. Antigenic factor 5 consists of the  $\beta$ -1,2-linked mannose residues within the acid-labile fraction. Antigenic factor 6 consists of  $\beta$ -1,2- and  $\alpha$ -1,2-linked mannose residues and is specific to *C. albicans* serotype A.

present in the acid-labile fraction of *C. albicans* mannan. Antigenic factor 6 corresponds to the  $\beta$ -linked mannose residues at the non-reducing end of the  $\alpha$ -1,2-linked lateral chains specific for the mannan acid-stable fraction of *C. albicans* serotype A (Fig. 1). The more ubiquitous antigenic factor 1 consists of  $\alpha$ -1,2 linked mannosides present both in the O-linked and N-linked chains of *C. albicans* and *S. cerevisiae* (Ataoglu et al., 1993).

Beside mannans, the yeast cell wall is also composed of  $\beta$ -1,3 or  $\beta$ -1,6-linked glucans which are expressed more deeply in the cell wall (Kapteyn et al., 2000). Despite the availability of mAb against  $\beta$ -glucans, determination of surface expression levels of these glycans has been mainly performed using a chimeric dectin-1 (Gantner et al., 2005). Poorly accessible at the surface, they can be exposed after heating of the yeast. They are nonetheless accessible during budding where mother-daughter cell separation occurs.  $\beta$ -linked glucans are recognized by the dectin-1 which mediates binding to macrophage membrane and initiates inflammatory responses (Torosantucci et al., 2000; Hahn et al., 2003) in a TLR-2-dependent manner (Brown et al., 2003).

Although flow cytometry has been recognized as a powerful technique for probing cell surface antigens, this method has previously had limited application in the study of pathogenic microorganisms and particularly in studies of the expression of such antigens with antibodies, most of which induce agglutination of the targeted microbes. For yeasts, cytometry has been used mainly to evaluate their sensitivity to antifungi (Mitchell et al., 2005) through staining with fluorescent probes (Pina-Vaz et al., 2005). Other data concerned mannoprotein expression revealed by lectins, which are not antigen specific, but detect ubiquitous glycan structures (Warolin et al., 2005). Thus very few data are available concerning surface expression of glycans detected by antibodies (Mercuré et al., 1996; Wheeler and Fink, 2006) and an important part of our understanding of the dynamics of their expression by the yeast and its pathophysiologic relevance, has come from studies based on Western blotting or immunofluorescence assays. In this work, we exploited flow cytometry methods for probing selected surface glycan antigens of pathogenic significance that are present at the surface of the yeast cell wall of either *C. albicans* or *S. cerevisiae*. For this, both monoclonal and polyclonal antibodies with similar or different specificities were used. We also took advantage of this method to examine the expression of surface components according to the growth conditions in culture. Our results showed that the expression levels of  $\alpha$ - and  $\beta$ -1,2 mannosides and  $\beta$ -glucans can be successfully studied by flow cytometry methods not involving agglutination

reactions. Moreover, detection of surface  $\beta$ -1,2 mannosides by a specific mAb, 5B2, or by pAb directed against antigenic factor 5 or 6 was shown to be different during the growth course, demonstrating the usefulness of the method for probing specific epitopes.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Yeast strains

Four different strains of *C. albicans* (serotype A), SC5314 (wild type *URA3URA3*; Gillum et al., 1984), CAF2 (*Ura3 $\Delta$ :: $\Delta$ imm434/URA3*; Fonzi and Irwin, 1993), CA1-4 (*ura3 $\Delta$ :: $\Delta$ imm434/ura3 $\Delta$ :: $\Delta$ imm434*; Fonzi and Irwin, 1993) and BWP17 (*ura3 $\Delta$ ::imm434/ura3 $\Delta$ ::imm434 his1 $\Delta$ /his1 $\Delta$ arg4 $\Delta$ /arg4 $\Delta$* ; Wilson et al., 1999) and the reference strain of *S. cerevisiae*, S288C, were used throughout this study. Yeast cells were maintained at 4 °C in YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose)-agar medium. Before the experiments, cells were transferred onto fresh YPD and incubated in an Erlenmeyer flask by shaking at 37 °C for 14 h. YPD medium was supplemented with uridine (20  $\mu$ g/ml) or uridine, histidine (20  $\mu$ g/ml) and arginine (20  $\mu$ g/ml) for CA14 and BWP17 strains respectively. In some experiments, heat-killed yeasts were used. For this, the cells were incubated for 20 min at 90 °C, and washed once in PBS.

### 2.2. Reagents and antibodies

All reagents were obtained from Sigma (Sigma Aldrich Chimie, Saint Quentin Fallavier, France). The anti- $\beta$ -1,2 mannoside monoclonal antibody 5B2, a rat IgM, was developed in our laboratory (Poulain et al., 1991). Rabbit polyclonal antibodies against antigenic factors 1, 5 and 6 were purchased from Iatron (Tokyo, Japan). Anti- $\beta$ -1,3 glucans, a mouse monoclonal IgG, was provided by Biosupplies (Pty, Australia). The anti- $\alpha$ -1,2 mannoside monoclonal antibody EB-CA1, a rat IgM, was from Bio-Rad SA, Marnes la Coquette, France. Fluorescein isothiocyanate (FITC)- and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-rat IgM, anti-mouse IgG or anti-rabbit IgG were obtained from Southern Biotechnology Laboratories (Birmingham, AL).

### 2.3. Flow cytometry

Blastoconidia ( $10^6$  cells) were washed with PBS containing 2% FCS and then incubated for 15 min with either anti- $\alpha$ -1,2 mannosides (EB-CA1, 13.2  $\mu$ g/ml; Factor 1, diluted 1/100), anti- $\beta$ -1,2 mannosides (5B2, 8  $\mu$ g/ml; Factor 5 or Factor 6, diluted 1/200), or anti- $\beta$ -1,3

glucans (20 µg/ml) antibodies. After washing, yeast cells were incubated for 15 min with specific secondary antibodies FITC or PE-labeled, diluted 1/100. Negative control was performed by adding labeled second antibody only at the same concentration. All processes were carried out at 4 °C. After washing, cells were fixed with 0.4% paraformaldehyde and examined by fluorescence-activated cell sorter (FACS).

Flow cytometry was performed using an EPICS XLMCL4 (Beckman Coulter, High Wycombe, UK) equipped with an argon ion laser with an excitation power of 15 mW at 488 nm. Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) were analyzed on linear scales, while green (FL1) and red fluorescence intensity (FL2) were analyzed on logarithmic scales. Analysis gates were set around debris and intact cells on an FSC versus SSC dot plot. The fluorescence histograms of 5000 cells were generated using the gated data. Data acquisition and analysis were performed using WINMDI software (available from <http://facs.scripps.edu>). Mean fluorescence intensities were obtained by subtracting values for negative controls from the values given by each antigen.

#### 2.4. Microscopic examination and immunofluorescent staining

After 20 h of culture, yeast cells were plated onto ten-well microscopy slides (10<sup>6</sup> yeast in 50 µl per well) and allowed to dry overnight under a hood at 20 °C. After washing with PBS, the wells were blocked for 20 min with PBS-1% BSA, then incubated with EB-CA1, anti-β-1,3-Glucan or 5B2 antibodies (1/50 dilution in PBS-1% BSA) for 1 h and revealed with a 1/50 dilution of the corresponding FITC-conjugated secondary antibody for 1 h. Slides were then washed five times and mounted for microscopic examination.

### 3. Results

#### 3.1. β-1,2 mannosides recognized by 5B2 antibody are highly expressed in the *C. albicans* population but not by *S. cerevisiae*

We first examined the expression pattern of β-1,2 mannosides by *C. albicans* as determined by cytometry. These antigens are present on the surface of *C. albicans* but absent from *S. cerevisiae* (Cantelli et al., 1995). The specific mAb 5B2 was thus used to stain either *C. albicans* or *S. cerevisiae* strains. As expected, expression levels detected by the antibody in *C. albicans* strains were dose-dependent, reaching saturation with 20 µg/ml of antibody (Fig. 2A). The mean intensity of fluorescence obtained

with other *C. albicans* strains, stained with 10 µg/ml of 5B2 antibody, was similar, differing only in the antigen expression levels among the populations studied. In contrast, no staining was observed with *S. cerevisiae* (Fig. 2B) validating the results obtained with this cytometric method. No change in the morphology of yeast population could be observed after 5B2 antibody exposure, excluding the agglutination reactions usually induced by this antibody (Fig. 2C). Immunofluorescent staining performed on glass slides confirmed the results obtained by cytometry, i.e. staining of all cells, but with additional information about the distribution of antigen on the yeast surface (Fig. 2D), showing it to be concentrated in discrete domains over the external yeast cell wall surface.

#### 3.2. α-1,2-mannosides revealed by CA1 antibody staining are expressed homogeneously on *C. albicans* but not by *S. cerevisiae*

EB-CA1 is a mAb specific for α-1,2 linked mannosides epitopes expressed by *C. albicans* but not by *S. cerevisiae* (Jacquinot et al., 1998). The expression of α-1,2 mannosides analyzed with this antibody on *C. albicans* cells was dose-dependent and 100% of the population was positive in all cases (Fig. 3). When the staining was performed on other *C. albicans* strains, with 33 µg/ml of EB-CA1 antibody, the results obtained were similar. When *S. cerevisiae* was used as the target, staining was negative, confirming previous results obtained by immunofluorescence (data not shown) (Fig. 3B). As observed with the other antibodies involved in this study, the method used to stain the yeast did not lead to any changes in yeast morphology (Fig. 3C). Microscopic examination of yeast cells fixed on glass slides and stained with the classical immunofluorescent staining protocol, revealed that all cells were positive with a high and homogeneous distribution of the antigen on the yeast surface (Fig. 3D).

#### 3.3. α-1,2 mannosides revealed by antigenic factor 1 are expressed both by *C. albicans* and by *S. cerevisiae*

As the expression of α-1,2 mannosides determined with EB-CA1 antibody showed that *S. cerevisiae* did not present the same epitopes as *C. albicans*, we examined the distribution pattern of these mannosides using a pAb specific for α-1,2 mannosides presenting a higher degree of polymerization. As shown in Fig. 4, the expression of α-1,2 mannosides analyzed with antibody against antigenic factor 1 in *C. albicans* cells was dose-dependent. The majority of the population was positive for all antibody dilutions tested, while a

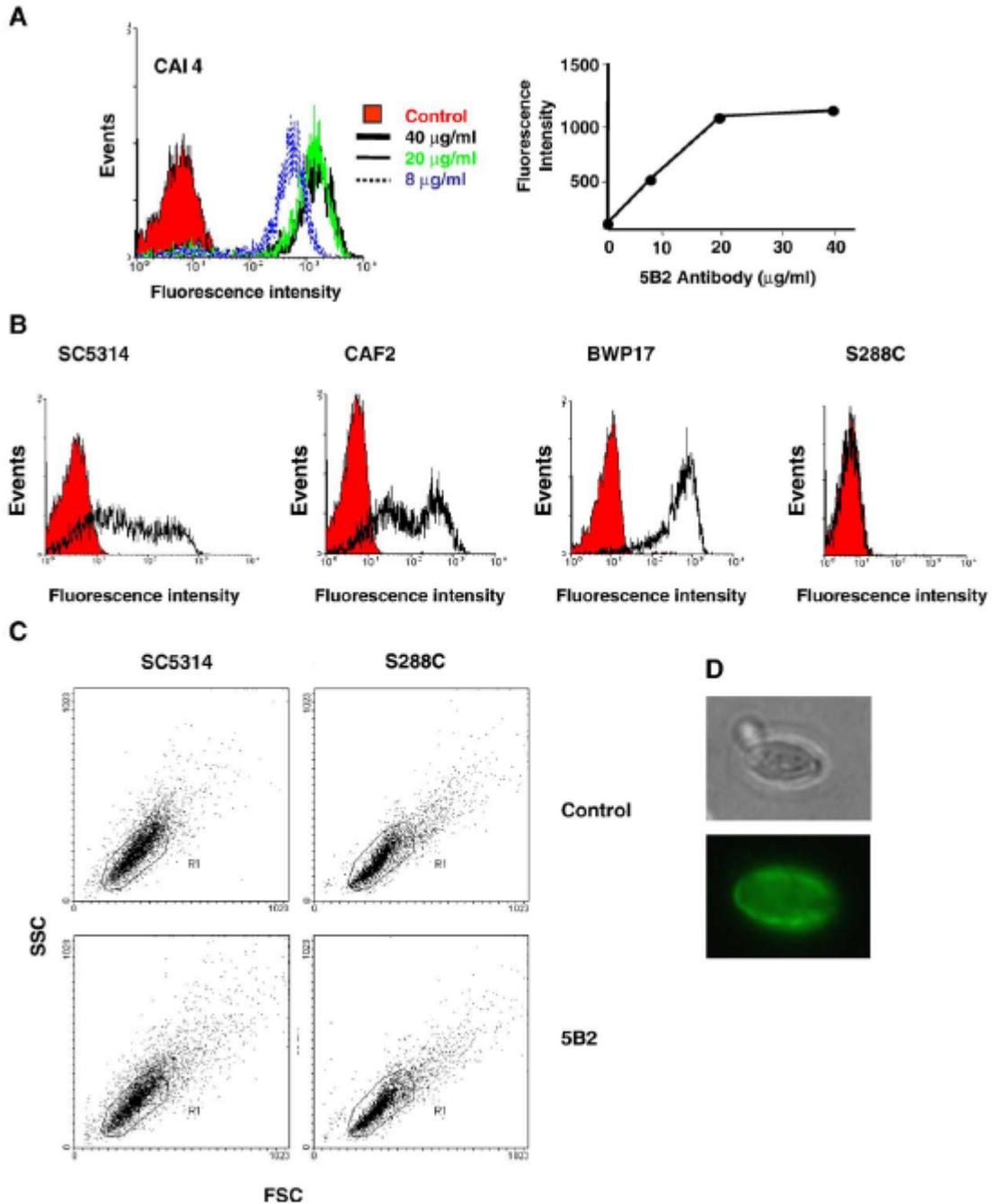


Fig. 2. 5B2 antibody staining of *C. albicans* and *S. cerevisiae* yeasts. (A) CAI-4 *C. albicans* strain was probed with 40  $\mu\text{g/ml}$  (black line), 20  $\mu\text{g/ml}$  (green line) or 8  $\mu\text{g/ml}$  (blue line) 5B2 antibody and compared with controls (red area) by flow cytometry. Right panel represents mean fluorescence intensities relative to antibody concentration. (B) SC5314 or CAF2 *C. albicans* or S288C *S. cerevisiae* strains were probed with 8  $\mu\text{g/ml}$  CAI antibody (open areas) and compared with controls (red areas). (C) Analysis of SC5314 and S288C yeast morphology by flow cytometry either in the presence or absence of 5B2 antibody. Histogram plots the cell size (SSC) on the vertical axis against cellular complexity (FSC). (D) CAI-4 *C. albicans* yeast cells were stained on slides with 40  $\mu\text{g/ml}$  CAI antibody and imaged by fluorescence microscopy.

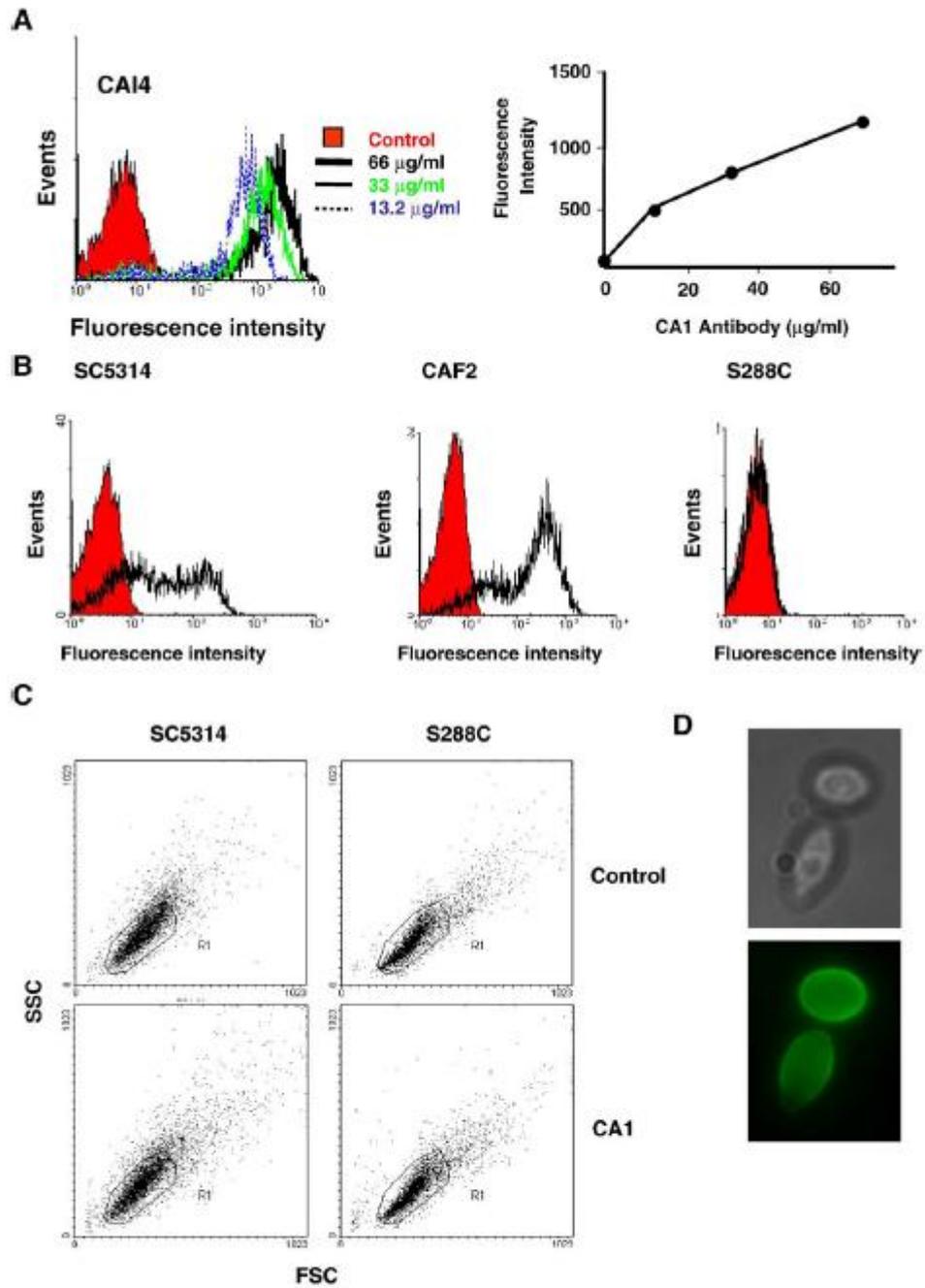


Fig. 3. CA1 antibody staining of *C. albicans* and *S. cerevisiae* yeasts. (A) CAI-4 *C. albicans* strain was probed with 66  $\mu\text{g/ml}$  (black line), 33  $\mu\text{g/ml}$  (green line) or 13.2  $\mu\text{g/ml}$  (blue line) CA1 antibody and compared with controls (red area) by flow cytometry. Right panel represents mean fluorescence intensities relative to antibody concentration. (B) SC5314 or CAF2 *C. albicans* or S288C *S. cerevisiae* strains were probed with 16.5  $\mu\text{g/ml}$  CA1 antibody (open areas) and compared with controls (red areas). (C) Analysis of yeast morphology by flow cytometry. Histogram plots the cell size (SSC) on the vertical axis against cellular complexity (FSC) either in the presence or absence of CA1 antibody. (D) CAI-4 *C. albicans* yeast cells were stained on slides with 66  $\mu\text{g/ml}$  CA1 antibody and imaged by fluorescence microscopy.

small subpopulation displayed expression levels similar to the negative control. When the staining was performed with this antibody on *S. cerevisiae* (1/100 dilution), 100% of the population was positive (Fig. 4B).

No changes in morphology of these yeasts could be observed after antigenic factor 1 antibody exposure, thereby excluding the possibility of agglutination reactions (Fig. 4C).

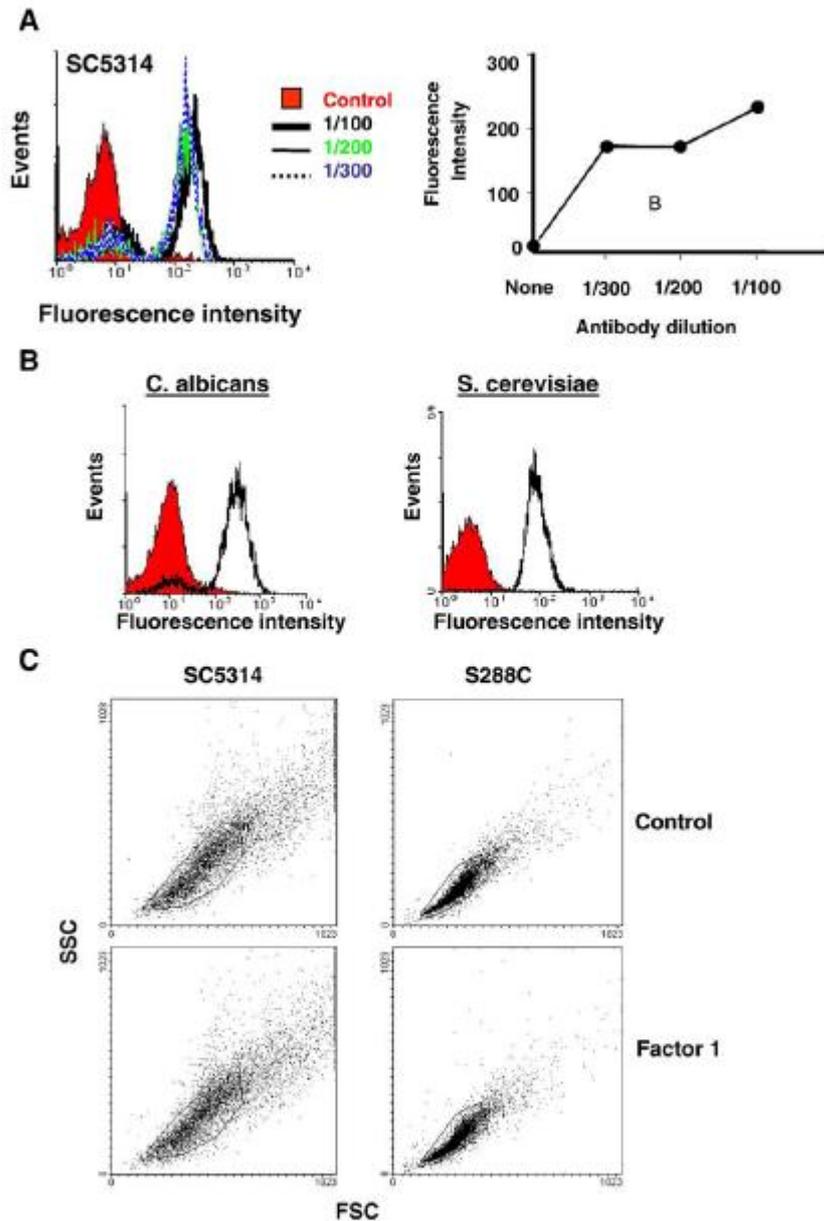


Fig. 4. Expression of antigenic factor 1 on *C. albicans* and *S. cerevisiae* cell wall surface. (A) SC5314 *C. albicans* strain was probed with 1/100 (black), 1/200 (green) or 1/300 (blue) antibody against factor 1 and compared with controls (red area) by flow cytometry. Right panel represents mean fluorescence intensities relative to antibody dilution. (B) SC5314 *C. albicans* or S288C *S. cerevisiae* strains were probed with 1/100 antibody against factor 1 (unshaded) and compared with controls (shaded). (C) Analysis of yeast morphology by flow cytometry in the presence or absence of antibody against factor 1.

### 3.4. Patterns recognized by antibodies to antigenic factors 5 and 6 are similar to those observed with 5B2 antibody

Antigenic factors 5 and 6 consist of  $\beta$ -1,2-linked mannopyranose units present in the *C. albicans* mannan acid-labile and acid-stable fraction, respectively. In contrast to antigenic factor 1, these factors are absent in the mannan of *S. cerevisiae*. As the expression of  $\alpha$ -1,2 mannosides determined with antigenic factor 1 or EB-CA1 antibodies were different, we thus verified the specificity of the  $\beta$ -1,2-linked mannoside staining obtained with the antibodies against antigenic factors 5 and 6 as compared with the one detected with 5B2 antibody. Three different dilutions of antibody were used to find the maximal staining efficiency avoiding agglutination reactions. As shown in Fig. 5, the fluorescence intensity resulted from staining of *C. albicans* yeast cells with pAb against antigenic factor 5 or 6 was dose-dependent, being more intense for factor 6 at all dilutions assessed. As expected, no staining was observed with *S. cerevisiae*. Analysis of the yeast morphology (data not shown) after antibody exposure, suggested that the *C. albicans* agglutination reaction did not occur.

### 3.5. Intact *C. albicans* and *S. cerevisiae* yeast cells both express $\beta$ -glucans poorly on the cell wall surface

To verify our previous results and test the efficiency of the cytometric method described here, we analyzed the staining obtained with another antibody against glycan molecules expressed on the cell wall but which does not induce classical agglutination reactions on *Candida* species. For this purpose we worked with the anti  $\beta$ -1, 3 glucan antibody, a mouse monoclonal IgG which has been shown to recognize identical epitopes involved in dectin-1 binding to yeasts (Wheeler and Fink, 2006).

The percentage of positively stained cells and the  $\beta$ -glucan expression levels in different *C. albicans* strains or *S. cerevisiae* yeasts, were almost insignificant in all cases (Fig. 6A). Immunofluorescent staining performed on glass slides, revealed similar results, with most of the cells negative and  $\beta$ -glucans only exposed in surface deformities that occur during budding growth and separation (Fig. 6B). This is in accordance with the results obtained by others using both similar and different technical approaches (Gantner et al., 2005; Fradin et al., 1996; Wheeler and Fink, 2006). The detection of  $\beta$ -glucans on the SC5314 *C.*

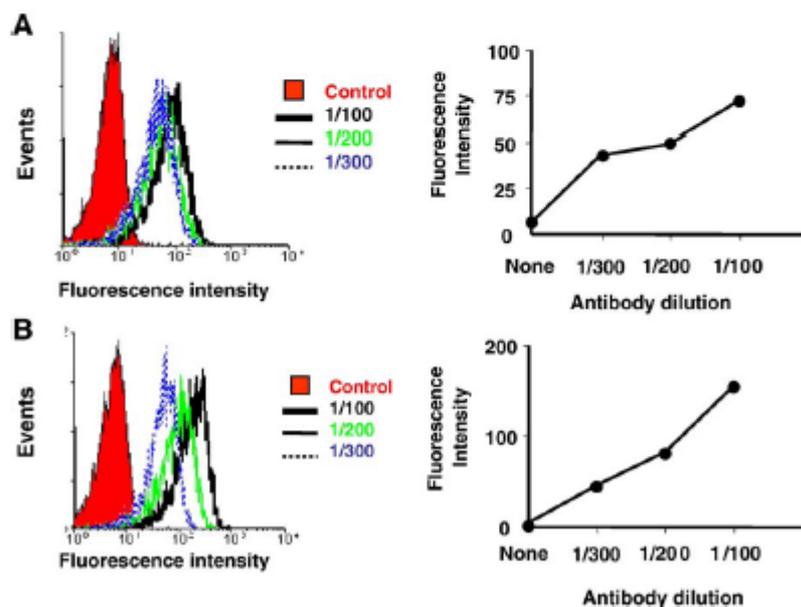


Fig. 5. Expression of antigenic factor 5 and 6 on *C. albicans* cell wall surface. CAI-4 cell yeasts were probed with 1/100 (black line), 1/200 (green line) or 1/300 (blue line) pAb against antigenic factor 5 (A) or 6 (B). Panels on the right represent mean fluorescence intensities for each antibody dilution.

*albicans* strain cell surface was, however, possible after heating (Fig. 6C), a treatment known to unmask  $\beta$ -glucans (Fradin et al., 1996; Gantner et al., 2005). These data thus indicated that  $\beta$ -glucans are not available on the cell surface of live yeast cells but that heat-treatment of yeast increased their exposure on the cell wall surface.

3.6. The expression of  $\beta$ -1,2-mannosides on the cell wall surface changes according to the growth phase of *C. albicans* yeasts

$\beta$ -1,2 mannosides expression has been shown to be modulated by different growth conditions. Both qualitative and quantitative changes at the level of the  $\beta$ -1,2-

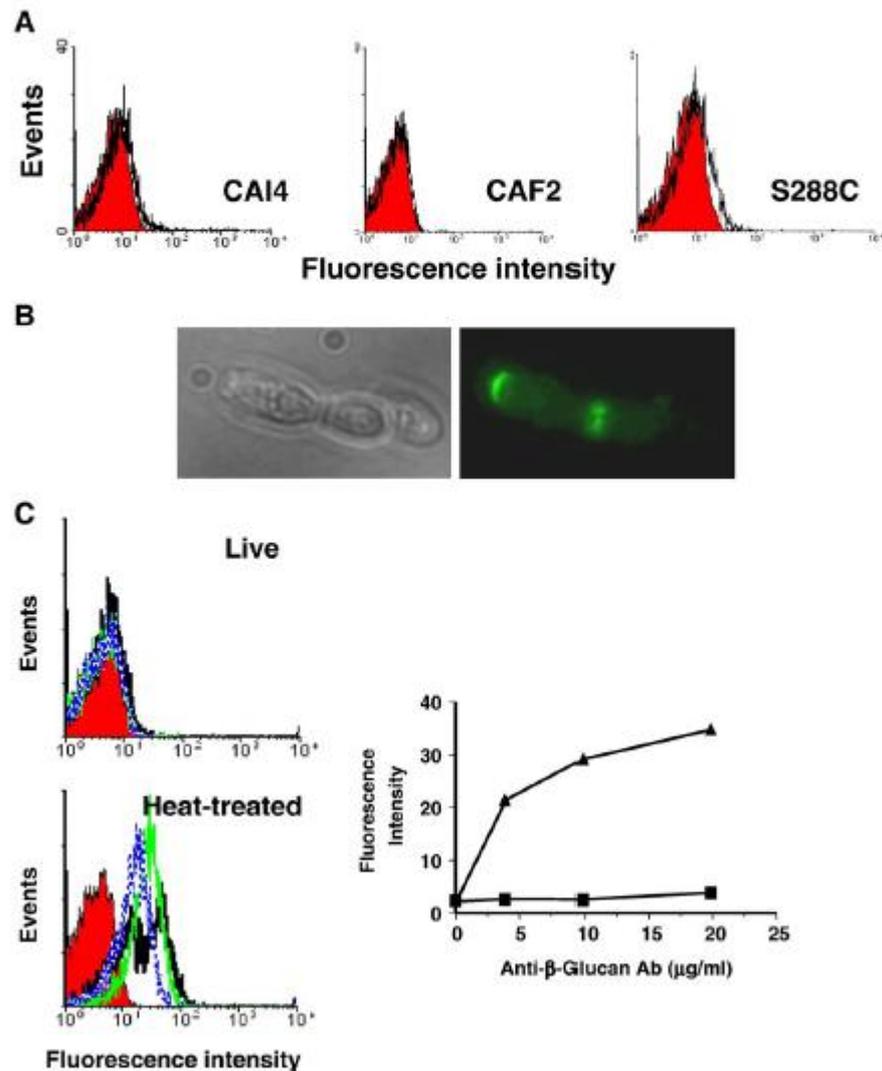


Fig. 6. Expression of  $\beta$ -glucans on *C. albicans* and *S. cerevisiae* cell wall surface. (A) Live CAI-4 or CAF2 *C. albicans* or S288C *S. cerevisiae* strains were probed with 20  $\mu$ g/ml anti  $\beta$ -1,3 glucans antibody (open areas) and compared with controls (red areas). (B) Live CAI-4 *C. albicans* yeast cells were stained on slides with 20  $\mu$ g/ml anti  $\beta$ -1,3-glucan antibody and imaged by fluorescence microscopy. (C) Live or heat-killed SC5314 *C. albicans* strain was probed with 20  $\mu$ g/ml (black), 10  $\mu$ g/ml (green) or 4  $\mu$ g/ml (blue) anti  $\beta$ -1,3-glucan antibody and compared with unstained control (red area) by flow cytometry. Right panel represents mean fluorescence intensities relative to antibody concentration in live (square) or heat-killed (triangle) yeast cells.

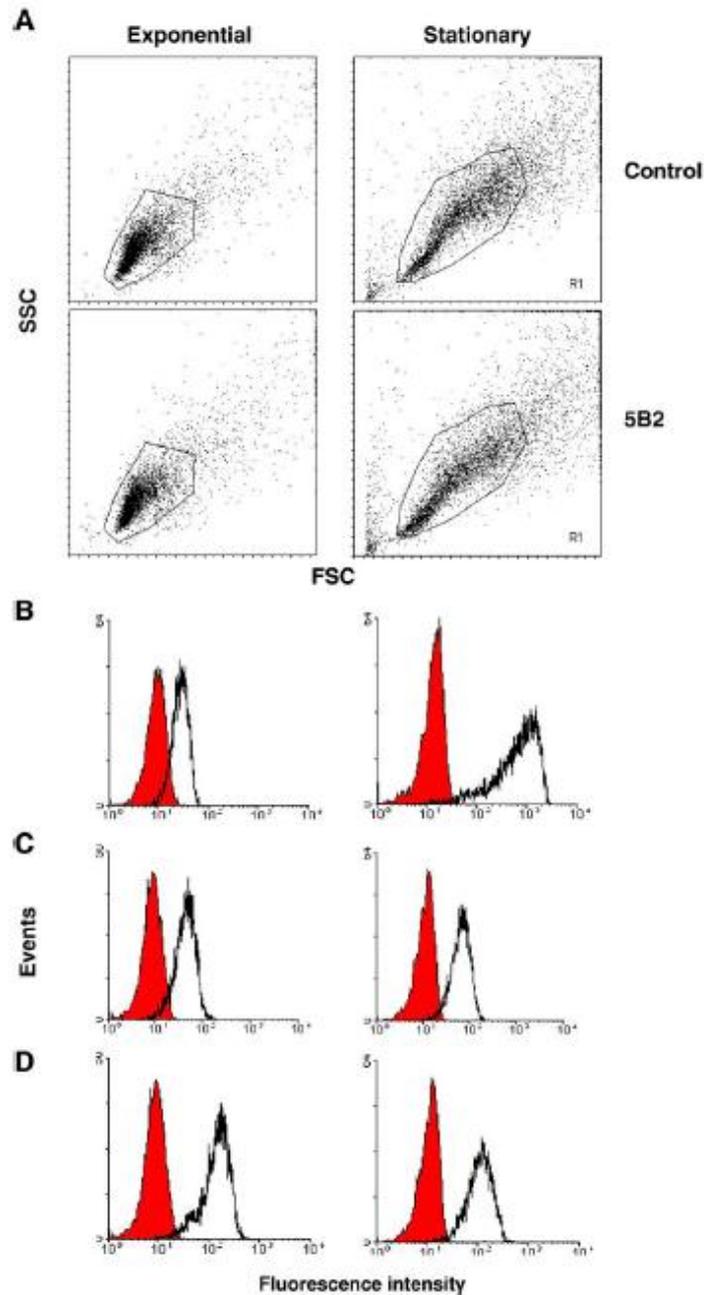


Fig. 7. The effect of growth phase on beta-mannoside staining of *C. albicans* yeasts. BWP17 *C. albicans* strain cultures were grown in YPD and harvested in exponential (O.D.<sub>600</sub> = 0.2–0.6, 3–4 h in culture) or stationary phase of growth (O.D.<sub>600</sub> = 1.5–3, 14–16 h in culture). (A) Cell morphology in the absence (top) or presence (bottom) of 5B2 antibody excluded the existence of agglutination reactions in both conditions of growth. (B) Exponential or stationary cultures of BWP17 cells were probed with 5B2 antibody, or antibodies against antigenic factor 5 (C) or 6 (D) and compared with unstained controls (shaded area). (Antibody stained cultures: unshaded).

oligomannoside chains have been evidenced during yeast-mycelial transition (Shibata et al., 1989), exposure to acidic conditions (Kobayashi et al., 1991), heating (Okawa et al., 1994), or at different growth phases (Jouault, personal communication). Using the various anti- $\beta$ -1,2-mannosides antibodies available for this study, we thus examined whether cytometry would permit detection of these differences. As shown in Fig. 7A, the morphology of the yeasts differed depending on the growth stage, with augmentation in cell size and complexity in the stationary phase, either after the staining with antibody or not.  $\beta$ -1,2-mannosides expression levels revealed with 5B2 antibody were modest during the exponential phase but increased noticeably during the course of growth, reaching maximum levels in the stationary phase (Fig. 7B). Exponential yeast cultures stained with antibody against factor 5 or 6 diluted 1/200 revealed similar antigen expression levels to that detected with 5B2 antibody (Fig. 7C and D respectively). However, in contrast to the expression pattern seen with 5B2, the level of the epitope recognized by anti factor 6 antibody, was unaffected by the phase of growth, while the epitope for anti factor 5 antibody, was very slightly increased in the stationary phase as compared to the exponential phase.

#### 4. Discussion

Interactions between yeasts and host cells involve the binding of target ligands expressed on the yeast cell surface to receptors present in the host cell membrane. For *C. albicans*, glycans play an important role in the continuous interchange that regulates the balance between saprophytism and parasitism (Poulain and Jouault, 2004). However, some of these molecular entities, which are expressed both by *C. albicans* and by *S. cerevisiae*, involve similar molecular mechanisms and receptors for recognition (Poulain and Jouault, 2004). Thus, understanding differences that allow discrimination of pathogenic from non-pathogenic yeasts appears to be of great importance. Mannans are recognized by several receptors initiating varied biological activities. The most representative macrophage receptor for the  $\alpha$ -linked mannosides is the mannose receptor (Linehan et al., 2000). It is mainly involved in the uptake and phagocytosis of microbes presenting these mannosides among which are the yeasts. DC-SIGN [dendritic cell-specific ICAM (intercellular adhesion molecule)-grabbing nonintegrin] has also been shown to be involved in the recognition of yeasts through  $\alpha$ -mannosides (Cambi et al., 2003), but it is poorly phagocytic and needs to cooperate with dectin-1 for internalization and cytokine production. In contrast to  $\alpha$ -

linked mannosides,  $\beta$ -1,2-mannosides recognition by macrophages involves a non-C lectin, namely galectin-3 (Fradin et al., 2000; Dalle et al., 2003). Whereas  $\alpha$ -mannosides induce cytokine production through a TLR-4-dependent pathway (Tada et al., 2002),  $\beta$ -1,2-oligomannosides stimulate pro-inflammatory cytokine production by cells in a TLR-2 dependent manner (Jouault et al., 2003).

Recognition of *C. albicans* by immune cells is thus followed by the induction of a variety of immunological mechanisms, whose function is to limit the damage caused by the organism (Romani, 2002). Thus identification of antigens expressed by the yeast that may interact with macrophage membrane receptors is of great importance for understanding the host–yeast interaction.

Among the different methods for such investigations, cytometry represents an easy way for exploring modulation and relative expression of the different antigens expressed at the cell surface. In parallel, genetic approaches have led to the availability of different mutants that are supposed to differently express such epitopes. However, very few data concerning antigenic characterization of these transformed yeasts have been obtained. The availability of different antibodies, either monoclonal or polyclonal, specific for some important fungal epitopes now makes possible such analysis. In this study, we explored the possibility of using well-defined antibodies, both monoclonal and polyclonal, to examine by flow cytometry the expression of glycan epitopes known to be of great importance in the pathophysiology of *C. albicans*.

Using either mAb or pAb, we demonstrated a clear-cut discrimination between  $\alpha$ - and  $\beta$ -linked mannose residues and within these epitope families, a good distinction between the antigens was obtained by the use of antibodies with different specificities. Mab EB-CA1, specific for *C. albicans* and other *Candida* species, is used for diagnosing *Candida* infections (Sendid et al., 1999). It recognizes small chains comprising at least four  $\alpha$ -1,2-linked oligomannose groups (Jacquinot et al., 1998) present in the acid-stable fraction of *Candida* mannan. Mab 5B2 reacts with at least two  $\beta$ -1,2-linked oligomannosides which are present in both the *C. albicans* mannan acid-stable and acid-labile fractions, also known as phosphomannan (Sendid et al., 2004). These oligomannose groups are also highly expressed on the glycolipid PLM (Trinel et al., 1992). Both mAb enabled specific detection of *C. albicans* by cytometry and the differentiation of *S. cerevisiae* without inducing agglutination reactions.

Antibodies to antigenic factors have been developed to identify strains of *C. albicans* according to the different possible glycans expressed in the cell wall mannan of the yeasts (Tsuchiya et al., 1974). Antigenic factor I has been determined as a linear chain of up to five  $\alpha$ -1,2 linked

mannose residues. It is expressed within the N-linked chains of mannan from several *Candida* species as in *C. albicans* serotypes A and B, but also in the O-linked mannose chains of the *S. cerevisiae* cell wall (Ataoglu et al., 1993). Results obtained in this study showed that in contrast to mAb EB-CA1, antibody to antigenic factor 1 was able to stain both *C. albicans* and *S. cerevisiae* surface  $\alpha$ -1,2 mannosides. This observation confirms that specific recognition by antibodies depends both on linkage anomaly and in the length of the mannoside chain recognized by the antibody (Jacquinot et al., 1998).

Antigenic factor 5 consists of  $\beta$ -1,2-linked mannosides present in the acid-labile fraction of mannan as oligomannose linked through a phosphodiester bond to the acid-stable fraction. Antigenic factor 6 is made of one or two terminal  $\beta$ -1,2-linked mannose groups attached to the side chain of the acid-stable fraction. Like 5B2 mAb, anti-antigenic factor 5 or 6 pAb detected successfully the presence of  $\beta$ -1,2-linked mannosides on the *C. albicans* surface, without inducing agglutination reactions in our experimental system. However, different surface expression levels were detected by these antibodies, showing that the epitopes recognized by them were differently accessible and modulated during the growth course. This indicates that antibodies with different specificities may reflect variation in composition of the epitope, which is expressed on the surface of the yeast, depending on the growth stage.

$\beta$ -glucans are expressed deep within the cell wall in both *C. albicans* or *S. cerevisiae*, and are not normally available on the cell surface of whole yeast cells (Wheeler and Fink, 2006), though heat-treatment of yeast is known to increase their exposure on the cell wall surface (Gantner et al., 2005; Fradin et al., 1996). Here, we have confirmed by flow cytometry that  $\beta$ -glucan exposure was increased after heat-treatment of yeast. This information is of great importance since several groups use heat-killed organisms to study interactions between yeasts and the immune system. Heat-treated yeasts not only lose viability but also several cell wall components relevant to the infective process, such as the antigens involved in receptor-mediated recognition by, and signal pathway triggering in, the host phagocytes. The changes induced by heating may thus lead to a very different final outcome.

In conclusion, the cytometric method described in this work has been shown to represent a useful tool for investigating to what extent *C. albicans* express glycan epitopes. This is particularly important for determining phenotypes of mutants with deletions of genes involved in glycosylation. The use of different antibodies makes it possible to distinguish the fine structure of the different glycan families relevant for pathophysiology. The

method also permits examination of the regulation of these glycan surface antigens and thereby exploration of how *C. albicans* may modify its virulence properties via changes in antigen expression.

### Acknowledgements

This work was supported in part by the European Community-Feder fund, program Interreg IIIA. María Martínez-Esparza was supported by the "Fundación Séneca", Spain.

### References

- Ataoglu, H., Zucco, J., Sentandreu, R., 1993. Characterization of epitopes recognized by *Candida* factor 1 and 9 antisera by use of *Saccharomyces cerevisiae* mnn mutants. *Infect. Immun.* 61, 3313.
- Brown, G.D., Herre, J., Williams, D.L., Willment, J.A., Marshall, A.S., Gordon, S., 2003. Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J. Exp. Med.* 197, 1119.
- Calderone, R.A., 2002. *Candida* and Candidiasis. ASM press, Washington.
- Calderone, R.A., Fonzi, W.A., 2001. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol.* 9, 327.
- Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J.M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G.J., Netea, M.G., Kullberg, B.J., Romani, L., Figdor, C.G., 2003. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 33, 532.
- Cantelli, C., Trinel, P.A., Bernigaud, A., Jouault, T., Polonelli, L., Poulain, D., 1995. Mapping of beta-1,2-linked oligomannosidic epitopes among glycoconjugates of *Candida* species. *Microbiology* 141, 2693.
- Dalle, F., Jouault, T., Trinel, P.A., Esnault, J., Mallet, J.M., d'Athis, P., Poulain, D., Bonnin, A., 2003. Beta-1,2- and alpha-1,2-linked oligomannosides mediate adherence of *Candida albicans* blastospores to human enterocytes in vitro. *Infect. Immun.* 71, 7061.
- Fonzi, W.A., Irwin, M.Y., 1993. Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* 134, 717.
- Fradin, C., Jouault, T., Mallet, A., Mallet, J.M., Camus, D., Sinay, P., Poulain, D., 1996. Beta-1,2-linked oligomannosides inhibit *Candida albicans* binding to murine macrophage. *J. Leukoc. Biol.* 60, 81.
- Fradin, C., Poulain, D., Jouault, T., 2000. Beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect. Immun.* 68, 4391.
- Gantner, B.J., Simmons, R., Underhill, D.M., 2005. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J.* 24, 1277.
- Gillum, A.M., Tsay, E.Y., Kirsch, D.R., 1984. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* and *E. coli pyrF* mutations. *Mol. Gen. Genet.* 198, 179.
- Hahn, P.Y., Evans, S.E., Kotton, T.J., Standing, J.E., Pagano, R.E., Limper, A.H., 2003. *Pneumocystis carinii* cell wall beta-glucan induces release of macrophage inflammatory protein-2 from alveolar epithelial cells via a lactosylceramide-mediated mechanism. *J. Biol. Chem.* 278, 2043.
- Jacquinot, P.M., Plancke, Y., Sendik, B., Strecker, G., Poulain, D., 1998. Nature of *Candida albicans*-derived carbohydrate antigen

- recognized by a monoclonal antibody in patient sera and distribution over *Candida* species. FEMS Microbiol. Lett. 169, 131.
- Jouault, T., Fradin, C., Trind, P.A., Bernigaud, A., Poulain, D., 1998. Early signal transduction induced by *Candida albicans* in macrophages through shedding of a glycolipid. J. Infect. Dis. 178, 792.
- Jouault, T., Iyata-Ombetta, S., Takeuchi, O., Trinel, P., Sacchetti, P., Lefebvre, P., Akira, S., Poulain, D., 2003. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through Toll-like receptors. J. Infect. Dis. 188, 165.
- Kapteyn, J.C., Hoyer, L.L., Hecht, J.E., Muller, W.H., Andel, A., Verdeij, A.J., Makarow, M., Van Den Ende, H., Klis, F.M., 2000. The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. Mol. Microbiol. 35, 601.
- Kobayashi, H., Giummelly, P., Takahashi, S., Ishida, M., Sato, J., Takaku, M., Nishida, Y., Shibata, N., Okawa, Y., Suzuki, S., 1991. *Candida albicans* serotype A strains grow in yeast extract-added Sabouraud liquid medium at pH 2.0, elaborating mannans without beta-1,2 linkage and phosphate group. Biochem. Biophys. Res. Commun. 175, 1003.
- Kobayashi, H., Shibata, N., Suzuki, S., 1992. Evidence for oligomannosyl residues containing both beta-1,2 and alpha-1,2 linkages as a serotype A-specific epitope(s) in mannans of *Candida albicans*. Infect. Immun. 60, 2106.
- Linehan, S.A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S., 2000. Macrophage lectins in host defence. Microbes Infect. 2, 279.
- Mercure, S., Senechal, S., Auger, P., Lemay, G., Montplaisir, S., 1996. *Candida albicans* serotype analysis by flow cytometry. J. Clin. Microbiol. 34, 2106.
- Mitchell, M., Hudspeth, M., Wright, A., 2005. Flow cytometry susceptibility testing for the antifungal caspofungin. J. Clin. Microbiol. 43, 2586.
- Nitz, M., Ling, C., Otter, A., Cutler, J., Bundle, D., 2002. The unique structure and immunochemistry of the *Candida albicans* beta-1,2 mannopyran cell wall antigen. J. Biol. Chem. 277, 3440.
- Okawa, Y., Takahata, T., Kawamata, M., Miyuchi, M., Shibata, N., Suzuki, A., Kobayashi, H., Suzuki, S., 1994. Temperature-dependent change of serological specificity of *Candida albicans* NIH A-207 cells cultured in yeast extract-added Sabouraud liquid medium: disappearance of surface antigenic factors 4, 5, and 6 at high temperature. FEBS Lett. 345, 167.
- Pina-Vaz, C., Costa-de-Oliveira, S., Rodrigues, A.G., Espinel-Ingroff, A., 2005. Comparison of two probes for testing susceptibilities of pathogenic yeasts to voriconazole, itraconazole, and caspofungin by flow cytometry. J. Clin. Microbiol. 43, 4674.
- Poulain, D., Jouault, T., 2004. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. Curr. Opin. Microbiol. 7 (4), 342.
- Poulain, D., Mackenzie, D.W., Van Cutsem, J., 1991. Monoclonal antibody-gold silver staining dot assay for the detection of antigenaemia in candidosis. Mycoses 34, 221.
- Poulain, D., Slomiansky, C., Jouault, T., Gomez, J.M., Trinel, P.A., 2002. Contribution of phospholipomannan to the surface expression of beta-1,2-oligomannosides in *Candida albicans* and its presence in cell wall extracts. Infect. Immun. 70, 4323.
- Romani, L., 2002. Immunology of invasive Candidiasis. In: Calderone, R. (Ed.), *Candida and Candidosis*. ASM Press, Washington DC, p. 223.
- Sendid, B., Tabouret, M., Poirot, J.L., Mathieu, D., Fruit, J., Poulain, D., 1999. New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating *Candida albicans* mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. J. Clin. Microbiol. 37, 1510.
- Sendid, B., Jouault, T., Coudriau, R., Camus, D., Odds, F., Tabouret, M., Poulain, D., 2004. Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of alpha- and beta-linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. J. Clin. Microbiol. 42, 164.
- Shibata, N., Ichikawa, T., Tojo, M., Takahashi, M., Ito, N., Otaubo, Y., Suzuki, S., 1985. Immunochemical study on the mannans of *Candida albicans* NIH A-207, NIH B-792, and J-1012 strains prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide. Arch. Biochem. Biophys. 243, 338.
- Shibata, N., Fukasawa, S., Kobayashi, H., Tojo, M., Yonezu, T., Ambo, A., Okubo, Y., Suzuki, S., 1989. Structural analysis of phospho-D-mannan-protein complexes isolated from yeast and mold form cells of *Candida albicans* NIH A-207 serotype A strain. Carbohydr. Res. 187, 239.
- Shibata, N., Kobayashi, H., Takahashi, S., Okawa, Y., Hisamichi, K., Suzuki, S., 1991. Structural study on a phosphorylated mannotriose obtained from the phosphomannan of *Candida albicans* NIH B-792 strain by acetolysis. Arch. Biochem. Biophys. 290, 535.
- Suzuki, S., 1997. Immunochemical study on mannans of genus *Candida*. I. Structural investigation of antigenic factors 1, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 13b and 34. Curr. Top. Med. Mycol. 8, 57.
- 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., 2002. *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. 46, 503.
- Torosantucci, A., Chiani, P., Cassone, A., 2000. Differential chemokine response of human monocytes to yeast and hyphal forms of *Candida albicans* and its relation to the beta-1,6 glucan of the fungal cell wall. J. Leukoc. Biol. 68, 923.
- Trinel, P.A., Faille, C., Jacquinet, P.M., Cailliez, J.C., Poulain, D., 1992. Mapping of *Candida albicans* oligomannosidic epitopes by using monoclonal antibodies. Infect. Immun. 60, 3845.
- Trinel, P.A., Maes, E., Zanetta, J.P., Delplace, F., Coddeville, B., Jouault, T., Strecker, G., Poulain, D., 2002. *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. J. Biol. Chem. 277, 37260.
- Tsuchiya, T., Fukawaza, Y., Taguchi, M., Nakase, T., Shinoda, T., 1974. Serological aspects of yeast classification. Mycopathol. Mycol. Appl. 53, 77.
- Warolin, J., Essmann, M., Larsen, B., 2005. Flow cytometry of *Candida albicans* for investigations of surface marker expression and phagocytosis. Ann. Clin. Lab. Sci. 35, 302.
- Wheeler, R.T., Fink, G.R., 2006. A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. PLoS Pathog. 2, e35.
- Wilson, R.B., Davis, D., Mitchell, A.P., 1999. Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. J. Bacteriol. 181, 1868.

## **ARTICLE 3**

A Method for Examining Glycans Surface Expression  
of Yeasts by Flow Cytometry

# Chapter 8

## A Method for Examining Glycans Surface Expression of Yeasts by Flow Cytometry

Maria Martínez-Esparza, Aurore Sarazin, Daniel Poulain, and Thierry Jouault

### Abstract

Recognition of pathogenic yeasts by host cells is based on components of the yeast cell wall, which are considered part of its virulence attributes. Cell wall glycans play an important role in the continuous interchange that regulates the balance between saprophytism and parasitism and between resistance and infection. Flow cytometry is a useful method for probing surface yeast glycans in order to compare their expression depending on strains and growth conditions. By using different monoclonal or polyclonal antibodies, levels of  $\beta$ - and  $\alpha$ -linked mannosides as well as  $\beta$ -glucans can be successfully evaluated by flow cytometry methods. The cytometric method we describe here represents a useful tool to investigate to what extent yeasts are able to regulate their glycan surface expression and therefore modify their virulence properties.

**Key words:** *Candida albicans*; surface markers; glycans; cell wall.

---

### 1. Introduction

Interactions between yeasts and host cells involve the binding of target ligands expressed at the yeast cell surface to receptors present in the host cell membrane. Glycans play an important role in the continuous interchange that regulates the balance between saprophytism and parasitism (1). The outermost layers of the cell wall are made of phosphopeptidomannan (Fig. 8.1), a polymer of O- and N-linked mannose residues commonly referred to as mannan. The O-linked mannose residues consist of short chains of  $\alpha$ -1,2- and  $\alpha$ -1,3-linked mannose. The N-linked part consists of a backbone of  $\alpha$ -1,6-linked mannopyranose residues with branches composed of  $\alpha$ -1,2- and  $\alpha$ -1,3-linked mannopyranose

Steffen Rupp, Kai Sohn (eds.), *Host-Pathogen Interactions*, DOI: 10.1007/978-1-59745-204-5\_8, © 2008 Humana Press, Totowa, NJ

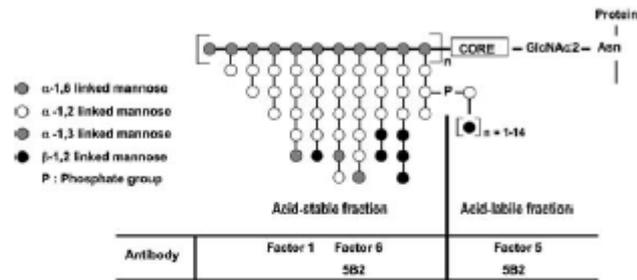


Fig. 8.1. Scheme of *C. albicans* N-linked mannan. The Man core group is attached to protein through two N-acetyl-glucosamine residues (GlcNAc<sub>2</sub>). The acid-stable fraction, recognized by factor 1, consists of the outer chain with  $\alpha$ -1,2- and  $\alpha$ -1,3-linked oligomannoside branches. Some  $\beta$ -1,2-mannosides linked to the  $\alpha$ -1,2-mannosides are recognized by factor 6 and mAb 5B2. Acid-labile fraction made of  $\beta$ -1,2-linked oligomannosides recognized by factor 5 and mAb 5B2 is linked to the acid-stable fraction by phosphodiester bond.

units. N-linked mannan can be resolved by mild acid hydrolysis into acid-stable fraction, consisting of all proximal mannose residues, and acid-labile fraction, which corresponds in *Candida* with phosphomannan made of  $\beta$ -1,2-linked mannose chains (2). In *Candida albicans*, additional linked  $\beta$ -1,2-mannosides are present as terminal mannosides of acid-stable fraction side chains and constitute the *C. albicans* serotype A (3). The serologic classification of Tsuchiya et al. (4), resulting from the serologic study on a variety of yeasts based on their agglutination abilities with a series of rabbit polyclonal antibodies (Iatron kit), has led to description of 10 antigenic factors more or less specific for the different strains of *Candida*. These factors have been used as tool to identify medically important *Candida* species in clinical specimens. Immunochemical investigations, carried out together with structural analysis of mannan from different strains of the genus *Candida*, have resulted in the definition of the epitopic structure of those antigenic factors (5). Among them, antigenic factor 5 consisted in the homopolymers of  $\beta$ -1,2-linked mannose present in the acid-labile fraction of *C. albicans* mannan. Antigenic factor 6 corresponds with the  $\beta$ -linked mannose residues at the nonreducing end of the  $\alpha$ -1,2-linked lateral chains specific for the mannan acid-stable fraction of *C. albicans* serotype A. The more ubiquitous antigenic factor 1 consists of  $\alpha$ -1,2-linked mannosides present both in the O-linked and N-linked chains of *C. albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* (for a description of the expression and accessibility of these antigenic factors, see Figs. 8.2 and 8.3).

The yeast cell wall is also composed of  $\beta$ -1,3- or  $\beta$ -1,6-linked glucans, which are expressed more deeply in the cell wall (6) and are poorly accessible at the surface. They can be exposed after

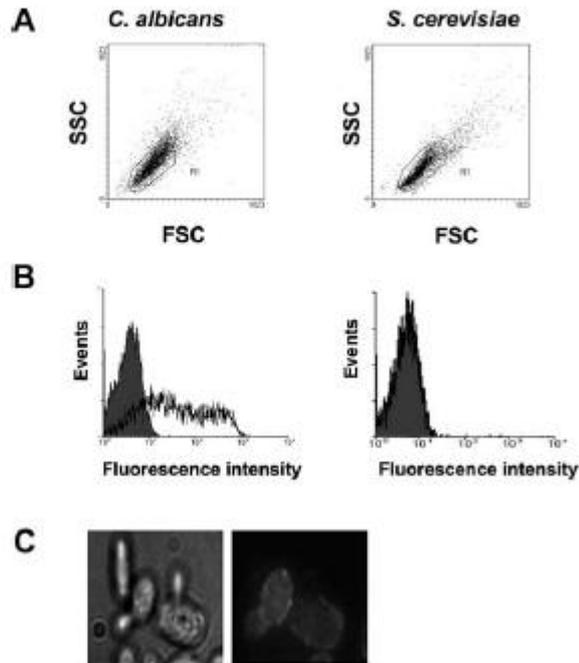


Fig. 8.2. Representative results obtained after staining of *C. albicans* and *S. cerevisiae* yeasts with 5B2 monoclonal antibody. (A) Analysis of yeast morphology by flow cytometry. Histogram plots the cell size (SSC) on the vertical axis against cellular complexity (FSC). The gate used for acquisition and data analysis is shown. (B) Histogram of fluorescence intensity obtained after staining of both yeasts with mAb 5B2 (unfilled area) compared with controls (filled area). (C) A detail of *C. albicans* yeast cells stained on slides with 5B2 mAb and imaged by fluorescence microscopy.

heating of the yeast (7, 8) (an example of such treatment and the resulting accessibility of these epitopes is shown in Fig. 8.4). They are nonetheless accessible during budding and at the levels of birth scars of yeast, where mother-daughter cell separation occurs (9).

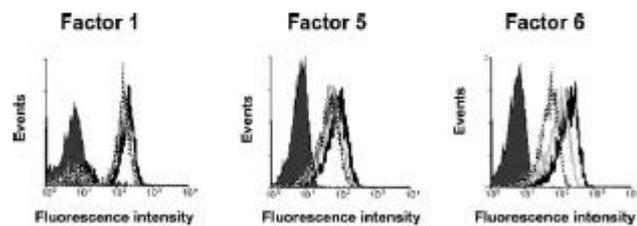


Fig. 8.3. Expression of antigenic factors on *C. albicans* cell wall surface. *C. albicans* strain was probed with 1/100 (solid line), 1/200 (thin line), or 1/300 (dashed line) antibody against factors 1, 5, and 6 and compared with controls (filled line) by flow cytometry.

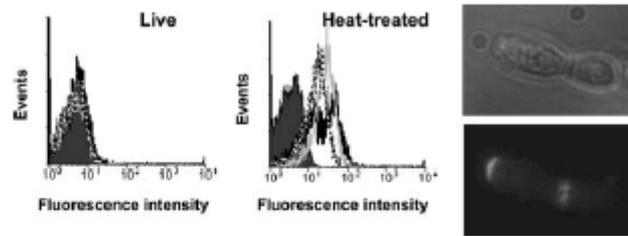


Fig. 8.4. Effect of heat treatment on  $\beta$ -glucan surface accessibility. Live or heat-killed *C. albicans* cells were probed with 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (solid line), 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (thin line), or 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (dashed line) of anti- $\beta$ -1,3-glucan mAb and compared with unstained control (filled) by flow cytometry. On the right is shown the microscopic examination of  $\beta$ -1,3-glucan distribution on live *C. albicans* yeast after staining with the mAb.

The most representative macrophage receptor for the  $\alpha$ -linked mannosides is the mannose receptor (10). It is mainly involved in the uptake and phagocytosis of microbes presenting these mannosides among which are the yeasts. DC-SIGN [dendritic cell-specific ICAM (intercellular adhesion molecule)-grabbing nonintegrin] has also been shown to be involved in recognition of yeasts through  $\alpha$ -mannosides (11), but it is poorly phagocytic. Recently, the participation of dectin-2 in the recognition of  $\alpha$ -mannosides has been evidenced (12, 13). In contrast with  $\alpha$ -linked mannosides, recognition of  $\beta$ -1,2-mannosides by macrophages involves a non-C lectin, galectin-3 (14, 15). Whereas  $\alpha$ -mannosides induced cytokine production through a TLR-4-dependent pathway (16),  $\beta$ -1,2-oligmannosides stimulate proinflammatory cytokine production by cells in a TLR-2-dependent manner in association with galectin-3 (7).  $\beta$ -linked glucans are recognized by dectin-1, which mediates binding to macrophage membrane and initiates inflammatory responses in a TLR-2-dependent manner (9, 17). Recognition of yeast cell wall glycans by immune cells through these different receptors and lectins is followed by the induction of a variety of immunologic mechanisms (18). Thus, identification of antigens expressed by the yeast that may interact with macrophage membrane receptors is of great importance for understanding the host-yeast interaction.

Among the different methods for such investigation, flow cytometry represents an easy way for exploring modulation and relative expression of the different antigens expressed at the cell surface. In parallel, genetic approaches have led to the availability of different mutants in glycosyl transferases that differently express such epitopes (19). A large range of antibodies, either monoclonal or polyclonal, specific for some

important *C. albicans* epitopes as well as specific lectins, are available. When involved in flow cytometry, they provide an easy way for exploring expression of glycans known to interact with innate immune receptors.

---

## 2. Materials

### 2.1. Yeast Cultures

1. The reference strains *C. albicans* (serotype A) SC5314 and *S. cerevisiae* S288C were used throughout this study.
2. YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) and YPD-agar medium (*see Note 1*).
3. Incubator with shaker.
4. Erlenmeyer flasks and Petri plates.
5. Spectrophotometer with 600-nm filter.

### 2.2. Antibodies (*see Note 2*)

1. The anti- $\beta$ -1,2-mannoside monoclonal antibody 5B2 is a rat IgM and has been developed in our laboratory. The anti- $\beta$ -1,3-glucan, a mouse monoclonal IgG, was provided by Biosupplies (Parkville, Australia).
2. Rabbit polyclonal antibodies against antigenic factors 1, 5, and 6 were from Iatron (Tokyo, Japan).
3. Fluorescein isothiocyanate (FITC)- and phycoerythrin (PE)-conjugated anti-rat IgM, anti-mouse IgG, or anti-rabbit IgG were obtained from Southern Biotechnology Laboratories (Birmingham, AL).

### 2.3. Flow Cytometry

1. Phosphate-buffered saline (PBS): Prepare 10X stock with 1.37 M NaCl, 27 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (adjust to pH 7.4 with HCl if necessary), and autoclave before storage at room temperature. Prepare working solution by dilution of one part with nine parts water.
2. Paraformaldehyde 0.4%. Use paraformaldehyde either diluted from commercial stock solution (37%) or prepare 0.4% (w/v) solution in PBS fresh for each experiment. In this case, the solution may need to be carefully heated (use a stirring hot-plate in a fume hood) to dissolve, and then cool to room temperature for use.
3. Fetal calf serum (FCS) is inactivated by heating at 56°C for 30 min.
4. Antibody dilution buffer and washing buffer: PBS containing 2% inactivated FCS.

### 3. Methods

Although based on similar technical approaches, flow cytometry and immunofluorescence staining bring complementary results. For each experiment, a microscopic examination should be performed before cytometry analysis. This allows one to verify the morphology and integrity of yeast cells and to determine the antigen distribution among individual cells, which is not possible with flow cytometry. We thus describe both methods giving examples of results obtained with both in order to allow comparison.

#### 3.1. Preparation of Yeasts

1. Yeast cells are maintained at 4°C in YPD-agar medium. Before the experiments, cells are transferred onto fresh YPD and incubated in an Erlenmeyer flask by shaking at 37°C. Cells are harvested in exponential ( $OD_{600} = 0.2$  to  $0.6$ , 3 to 4 h in culture) or stationary phase of growth ( $OD_{600} = 1.5$  to  $3$ , 14 to 16 h in culture).
2. Cells are washed once with PBS.
3. To estimate the concentration of yeast, the optical density of the yeast cultures are measured in a spectrophotometer at 600 nm or number of yeast cells are counted in a Neubauer hemacytometer chamber (1 OD is equivalent to  $2 \times 10^7$  yeast cells);  $10^6$  blastoconidia cells are used per sample.
4. To obtain heat-killed yeasts, cells are warmed for 20 min at 90°C and then washed once in PBS.

#### 3.2. Flow Cytometry Assay

1. Yeast cells are washed with PBS.
2. Samples are incubated at 4°C for 15 min with 20  $\mu$ L of first antibody in Eppendorf tubes (*see Note 3*) or with the same volume of antibody dilution buffer for negative controls (*see Notes 4* and *5*).
3. The primary antibody is washed twice with 500  $\mu$ L of washing solution. The washings consisted in resuspending the cells in washing solution, centrifugation at  $1000 \times g$  at 4°C for 6 min, and discarding the supernatant.
4. The secondary antibody (20  $\mu$ L) is incubated at 4°C for 15 min in Eppendorf tubes for all samples (*see Note 6*).
5. The secondary antibody is washed twice with 500  $\mu$ L of washing solution and once in PBS, as described previously (*see Note 7*).
6. After washing, cells are fixed with 0.4% paraformaldehyde and examined at the moment by fluorescence-activated cell sorter (FACS). The samples could also be maintained at 4°C up to 24 h before examination (*see Note 8*).

### 3.3. Flow Cytometry Acquisition and Analysis

1. Flow cytometry is performed using an EPICS XLMCL4 (Beckman Coulter, High Wycombe, UK) equipped with an argon ion laser with an excitation power of 15 mW at 488 nm.
2. Forward scatter (FSC) and side scatter (SSC) are analyzed on linear scales, whereas green (FL1) and red fluorescence intensity (FL2) are analyzed on logarithmic scales.
3. Analysis gates are set around debris and intact cells on an FSC versus SSC dot plot. The fluorescence histograms of 5000 cells are generated using the gated data.
4. Data analysis is performed using WINMDI software (available from <http://facs.scripps.edu>) (*see Note 9*).

### 3.4. Microscopic Examination and Immunofluorescent Staining

1. Yeast cells are plated onto 10-well microscopy slides ( $10^6$  yeast in 50  $\mu$ L per well) and allowed to dry overnight under hood at 20°C.
2. Dried preparation is delicately washed with 50  $\mu$ L of PBS per well and then aspirated dry.
3. Fifty microliters per well of PBS containing 1% BSA is added for blocking for 20 min at room temperature and then aspirated.
4. Cells are then incubated for 1 h at 37°C with 50  $\mu$ L of the primary antibody (generally 1/50 dilution) in PBS–1% BSA.
5. Unbound antibody is washed out by addition of 50  $\mu$ L of PBS–1% BSA and aspiration. This step is performed twice.
6. Fluorescent secondary antibody is then incubated for 1 h at room temperature. Generally, 50  $\mu$ L of 1/50 dilution of the corresponding FITC-conjugated secondary antibody is used.
7. Wells are then washed 5 times as above and allowed to dry.
8. The samples are then ready to be mounted. Ten microliters of mounting medium (such as Moviol) is then added to each well and recovered with a coverslip and sealed with nail polish (*see Note 10*). The sample can be examined immediately after the polish is dried or can be stored in the dark at 4°C for subsequent examination.
9. The slides are viewed under phase contrast microscopy (to locate the cells and identify the focal plane) and under fluorescence microscopy.

---

## 4. Notes



1. YPD medium should be supplemented when mutant strains are used.
2. Primary antibodies may be replaced by specific lectins conjugated either directly with fluorophores or biotinylated (both

- are available). In this case, the use of conjugated streptavidin will allow staining.
3. Flow cytometric assay could be performed in 96 V-bottom well plates instead of Eppendorf tubes. In this case, the washings consist in resuspending the cells with 180  $\mu$ L of washing solution, centrifugation of the plates at 800  $\times g$  at 4°C for 6 min, and discarding the supernatant.
  4. Homogenous labeling of yeasts with antibodies requires that yeasts are carefully mixed with antibody. This is performed by pipetting the suspension.
  5. Incubation steps should be performed under agitation. If using microtiter plates, this requires the use of a special apparatus.
  6. All steps with conjugated secondary antibodies should be performed with a cover to avoid light.
  7. Double staining may be realized for subsequent analysis either by flow cytometry or by microscopy. For this, if primary antibodies used are not conjugated, it is necessary that they have been obtained from two different species (mice and rat, for example) and to use different corresponding secondary antibodies (PE conjugated anti-mouse and FITC conjugated anti-rat antibodies, for example).
  8. Fluorescence is generally stable. However, analysis at the end of the experiment always gives optimal results. If not possible, samples in PFA can be stored at 4°C in the dark for 24 h.
  9. After data acquisition, mean fluorescence intensities are obtained by subtracting values for negative controls from the values given by each antigen.
  10. Air bubbles are undesirable in the mounting medium, and slow, careful application of the top layer minimizes their appearance.

---

### Acknowledgments

This work was supported in part by the European Community (Feder fund, program Interreg IIIA). María Martínez-Esparza was supported by the Fundación Séneca, Spain. Aurore Sarazin was supported by Region Nord-Pas de Calais.

### References

1. Poulain, D., and Jouault, T. (2004) *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol* **7**, 342–349.
2. Shibata, N., Kobayashi, H., Takahashi, S., Okawa, Y., Hisamichi, K., Suzuki, S., and Suzuki, S. (1991) Structural study on a phosphorylated mannotetraose obtained from the phosphomannan of *Candida albicans* NIH B-792 strain by acetolysis. *Arch Biochem Biophys* **290**, 535–542.
3. Kobayashi, H., Shibata, N., Osaka, T., Miyagawa, Y., Ohkubo, Y., and Suzuki, S.

- (1992) Structural study of cell wall mannan of a *Candida albicans* (serotype A) strain. *Phytochemistry* **31**, 1147–1153.
4. Tsuchiya, T., Fukazawa, Y., Taguchi, M., Nakase, T., and Shinoda, T. (1974) Serologic aspects on yeast classification. *Mycopathol Mycol Appl* **53**, 77–91.
  5. Suzuki, S. (1997) Immunochemical study on mannans of genus *Candida*. I. Structural investigation of antigenic factors 1, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 13, 13b and 34. *Curr Top Med Mycol* **8**, 57–70.
  6. Kapteyn, J. C., Hoyer, L. L., Hecht, J. E., Muller, W. H., Andel, A., Verkleij, A. J., Makarow, M., Van Den Ende, H., and Klis, F. M. (2000) The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* **35**, 601–611.
  7. Jouault, T., El Abed-El Behi, M., Martínez-Esparza, M., Breuilh, L., Trinel, P. A., Chamailard, M., Trottein, F., and Poulain, D. (2006) Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol* **177**, 4679–4687.
  8. Martínez-Esparza, M., Sarazin, A., Jouy, N., Poulain, D., and Jouault, T. (2006) Comparative analysis of cell wall surface glycan expression in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts by flow cytometry. *J Immunol Methods* **314**, 90–102.
  9. Gantner, B. N., Simmons, R. M., and Underhill, D. M. (2005) Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J* **24**, 1277–1286.
  10. Linehan, S. A., Martínez-Pomares, L., and Gordon, S. (2000) Mannose receptor and scavenger receptor: two macrophage pattern recognition receptors with diverse functions in tissue homeostasis and host defense. *Adv Exp Med Biol* **479**, 1–14.
  11. Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J. M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G. J., Netea, M. G., Kullberg, B. J., Romani, L., and Figdor, C. G. (2003) The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* **33**, 532–538.
  12. McGreal, E. P., Rosas, M., Brown, G. D., Zamze, S., Wong, S. Y., Gordon, S., Martínez-Pomares, L., and Taylor, P. R. (2006) The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology* **16**, 422–430.
  13. Sato, K., Yang, X. L., Yudate, T., Chung, J. S., Wu, J., Luby-Phelps, K., Kimberly, R. P., Underhill, D., Cruz, P. D., Jr., and Ariizumi, K. (2006) 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* **281**, 38854–38866.
  14. Fradin, C., Poulain, D., and Jouault, T. (2000) beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun* **68**, 4391–4398.
  15. Kohatsu, L., Hsu, D. K., Jegalian, A. G., Liu, F. T., and Baum, L. G. (2006) Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol* **177**, 4718–4726.
  16. Tada, H., Nemoto, E., Shimauchi, H., Watanabe, T., Mikami, T., Matsumoto, T., Ohno, N., Tamura, H., Shibata, K., Akashi, S., Miyake, K., Sugawara, S., and Takada, H. (2002) *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* **46**, 503–512.
  17. Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S., and Gordon, S. (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* **197**, 1119–1124.
  18. Romani, L., Bistoni, F., and Puccetti, P. (2002) Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol* **10**, 508–514.
  19. Odds, F. C., Brown, A. J., and Gow, N. A. (2004) *Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics. *Genome Biol* **5**, 230.

## B. Application à l'étude de la spécificité d'un anticorps monoclonal

L'anticorps 26G7, IgM de souris a été produit par une technique classique d'immunisation de souris BALB/c par injection sous-cutanée d'une glycoprotéine de 150 kDa issue de la paroi de *C. glabrata*. Des travaux d'Elguezabal *et al*, montrent que cet anticorps inhibe l'adhérence de souche de *Candida* sérotype A et ne réagit pas avec la paroi des souches de sérotype B (Elguezabal, *et al.*, 2004, Elguezabal, *et al.*, 2009).

La spécificité ainsi que la sensibilité du mAb 26G7 ont été évaluées par plusieurs techniques (Western blot, cytométrie en flux et luminex) sur différentes souches de levures.

### a. Western blot sur extraits totaux de levures

Le marquage du mAb 26G7 (1/1000 dilution) a été comparé avec ceux de 3 mAbs de références (EB-CA1, 5B2 et B9E) en technique Western blot sur des extraits totaux de levure. Le panel d'extraits se compose de 5 souches de *C. albicans* de sérotype A, une souche de *C. dubliniensis*, 2 souches de *C. glabrata*, 4 souches de *C. albicans* de sérotype B et une de *S. cerevisiae*.

L'anticorps EB-CA1 est spécifique des  $\alpha$ -1,2 mannosides présents les mannoprotéines et mannane des souches de sérotype A et B de *C. albicans*. Les  $\beta$ -1,2 oligomannosides sont détectés par le mAb 5B2 et l'anticorps B9E reconnaît un hétérodimère  $\beta/\alpha$ -mannosides (Fig 12).

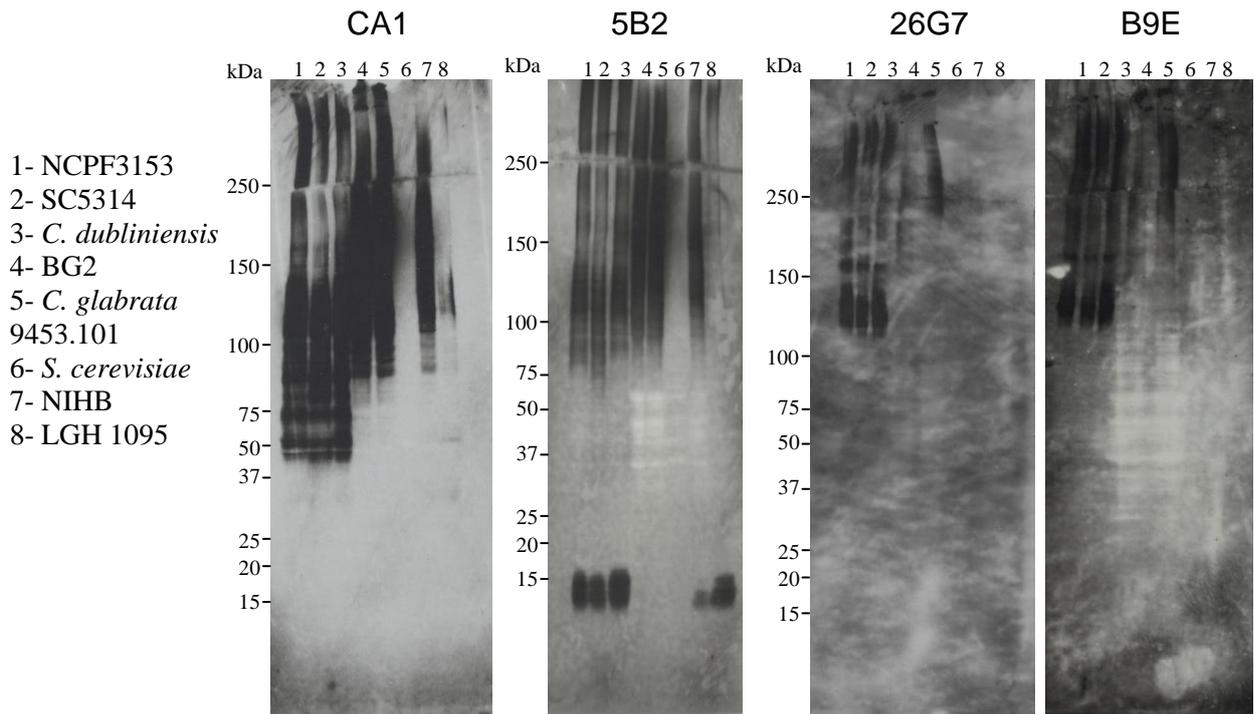


Figure 12: Réactivité des extraits des levures vis-à-vis des mAbs 5B2 (1:4000), EB-CA1 (1:1000), Cg26G7 (1:1000) et B9E (1:1000) en Western blot

Comme attendu, les souches de sérotype A et de sérotype B sont révélées par les mAbs CA1 et 5B2. De plus, *C. albicans* sérotype A, *C. dubliniensis* et *C. glabrata* sont marquées par le B9E. Les souches de sérotype B et *S. cerevisiae* ne sont pas détectés par cet anticorps. Le PLM des souches de sérotype A, B et *C. dubliniensis* est discriminé par le mAb 5B2.

Les glycoprotéines de *C. albicans* sérotype A, *C. dubliniensis* et *C. glabrata* sont reconnues par le mAb 26G7 contrairement aux souches de sérotype B de *C. albicans* et *S. cerevisiae*.

#### b. Cytométrie en flux

MAb 26G7 a été évalué en cytométrie de flux sur le même panel de souche que celui utilisé pour le Western blot (Fig 13).

Les réactivités du CA1 et 5B2 avec les différentes souches de levures sont identiques à celles obtenues en Western blot.

L'intensité de fluorescence optimale pour le 26G7 est obtenue à une dilution au 300<sup>ème</sup> de l'anticorps et un second anticorps anti-IgM de souris couplé à un fluorore dilué au 100<sup>ème</sup>. Plus de 50% de la population est marquée dans ces conditions.

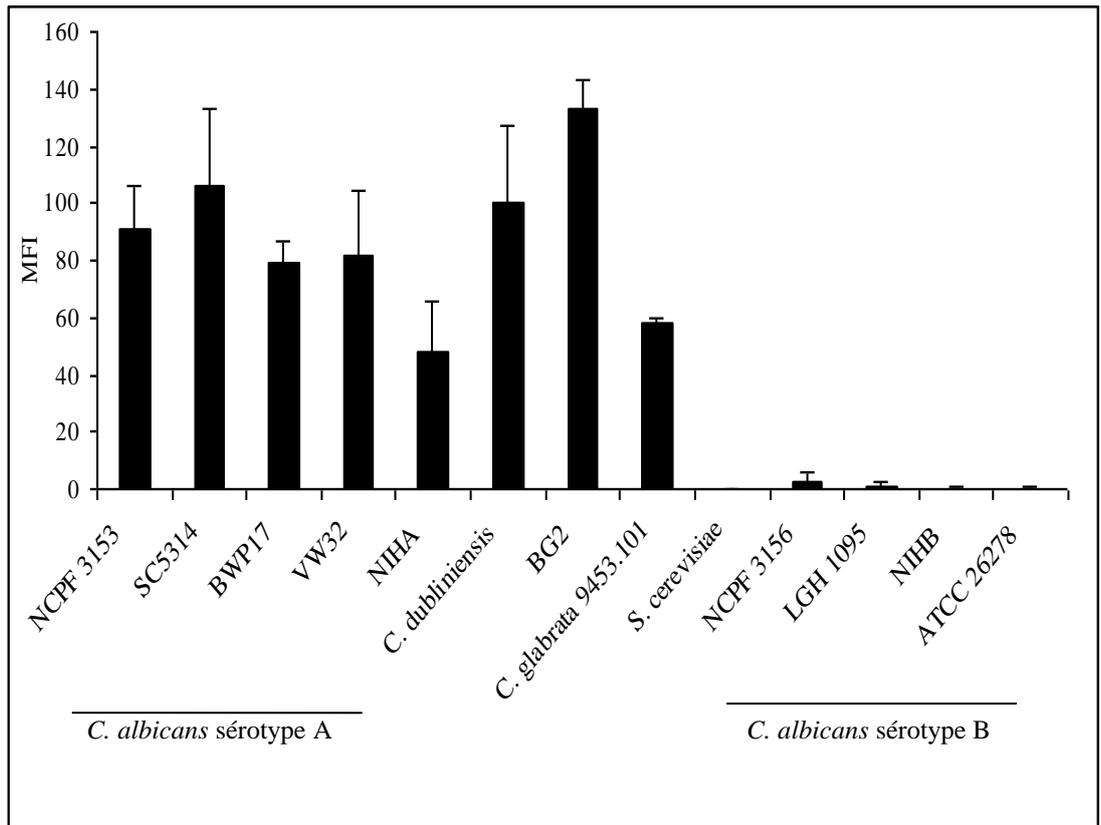


Figure 13: Moyenne des Intensités de fluorescence obtenues sur le panel de levure avec le mAb 26G7

Les résultats indiquent que l'anticorps 26G7 reconnaît *C. albicans* sérotype A, *C. dubliniensis* et des épitopes exprimés par une partie de la population de *C. glabrata*. En effet, deux populations sont observées : une négative et une autre fortement positive. La proportion de cellules négatives varie en fonction de l'expérience. Ceci peut être dû à une faible expression de l'épitope par une partie de la population (Fig 14).

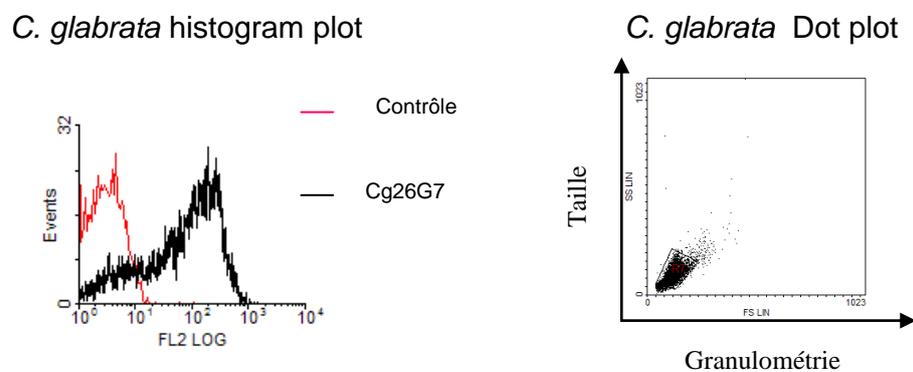


Figure 14: Histogramme de fluorescence et Dot Plot de *C. glabrata* après marquage avec le mAb 26G7

Le profil des différentes moyennes des intensités de fluorescence obtenues avec le mAb 26G7 est équivalent à ceux du mAb B9E (Fig 15).

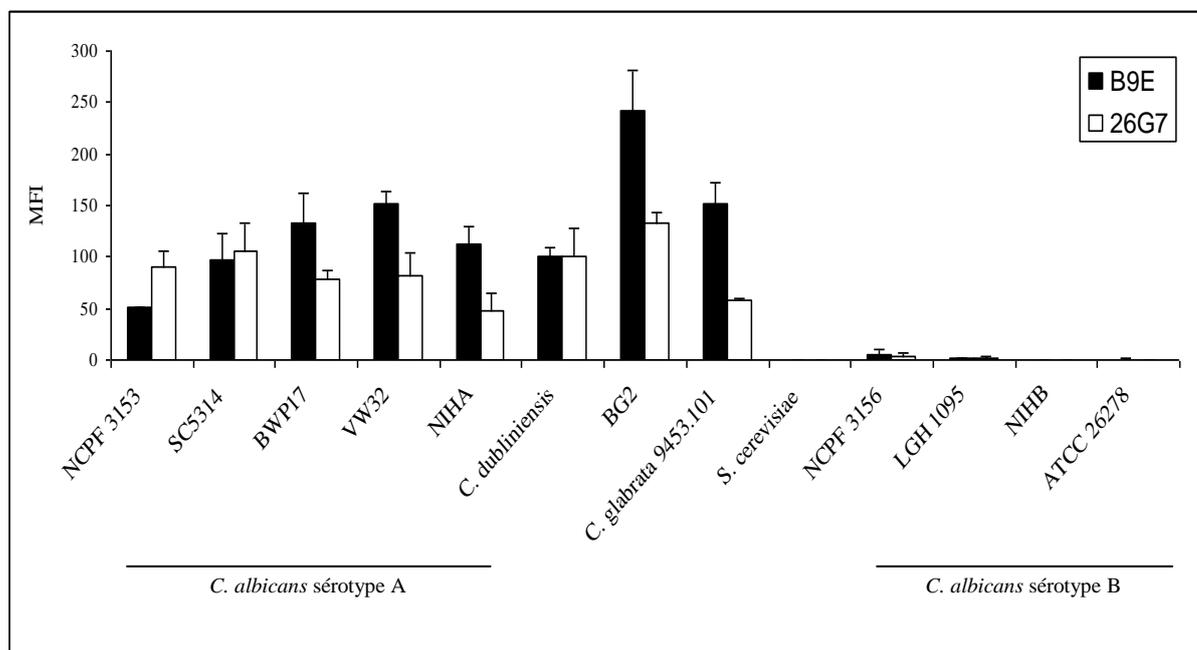


Figure 15 : Moyenne des intensités de fluorescence suite aux marquages des souches avec le mAb B9E (1/100) et le mAb 26G7 (1/300)

### c. Analyse par la méthode de Luminex

La réactivité du 26G7 a été testée sur des phosphopeptidomannanes (PPM) issus de différentes levures et sur des oligomannosides de synthèse, coatées sur des billes magnétiques en technologie luminex. Les mannanes des souches VW32, SC5314 et CAF-1-4 (culture à pH 2) de *C. albicans* sérotype A, de la souche SU1 de *S. cerevisiae* et de la souche NIHB de *C. albicans* sérotype B ont été testées de même que différents oligomannosides synthétiques ( $\alpha$ -1,2 mannosides ou  $\beta$ -1,2 mannosides).

La réactivité du 26G7 a été comparée à celle de l'anticorps de référence B9E. Les PPM-SU1 et de NIHB sont peu reconnus par le 26G7 et B9E tandis que les PPMs de VW32 et SC5314 sont révélés. La détection du mannane de CAF-1-4 (culture à pH2) est faible pour ces deux anticorps. Cependant, le marquage du 26G7 pour les PPMs de VW32 et de SC5314 est plus important comparé à celui obtenu pour le B9E (Fig 16).

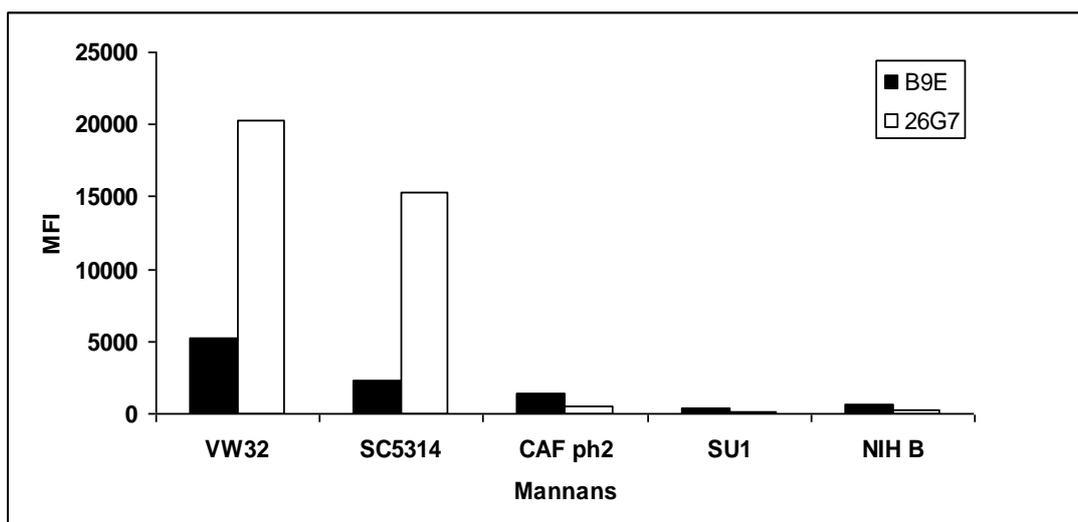


Figure 16: Moyenne des intensités de fluorescence obtenues sur les mannanes des différentes levures avec le mAb B9E et le mAb 26G7

En ce qui concerne les oligomannosides de synthèse, plusieurs configurations glycaniques ont été évaluées : di  $\alpha$ , tétra  $\alpha$ -mannosides, di  $\beta$ , tri  $\beta$  et tétra  $\beta$ -mannosides. Comme attendu, l'anticorps B9E révèle les  $\beta$ -mannosides et les  $\alpha$ -mannosides des glycannes synthétiques. Le mAb 26G7 réagit fortement avec les tri  $\beta$ -mannosides (Fig 17).

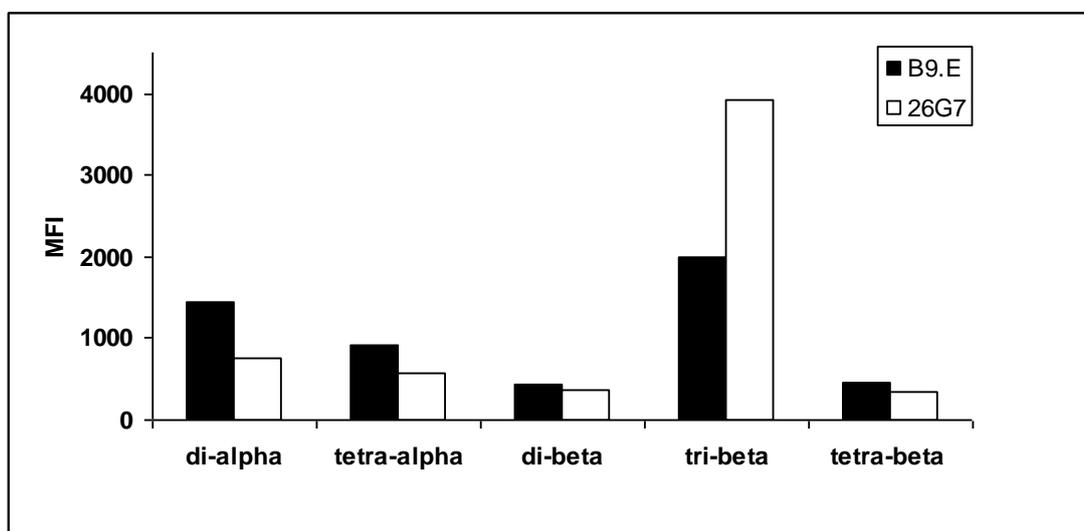


Figure 17 : Moyenne des intensités de fluorescence obtenues avec les oligomannosides synthétiques différentes levures avec le mAb B9E et le mAb 26G7

d. Western blot sur des mutants

Afin de déterminer le(s) épitope(s) reconnu(s) par le mAb 26G7, la réactivité de cet anticorps a été testée sur 3 mutants déficients en  $\beta$ -1,2 oligomannosides (Bmt1,2 et 3) (Fig 18) en technique Western blot (Fig 19).

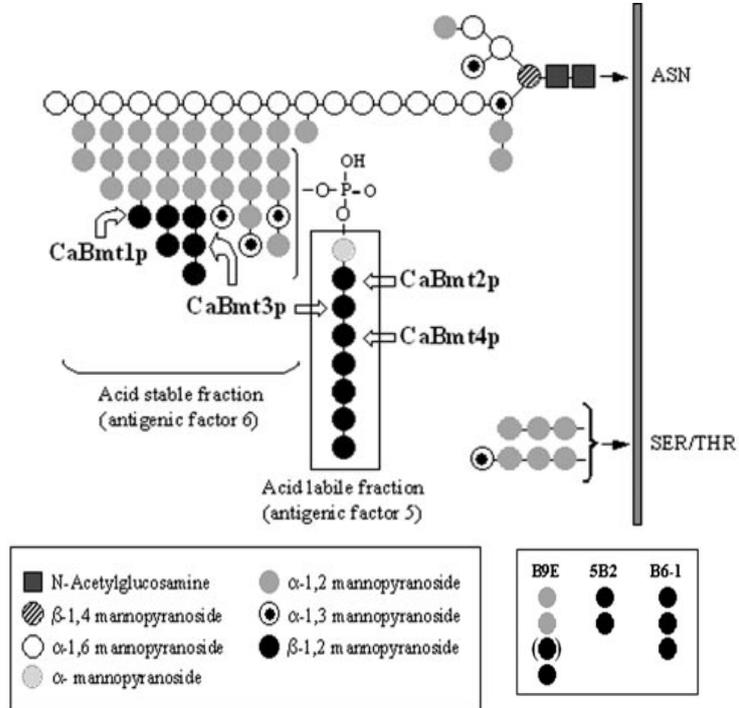


Fig 18: Identification des mutants sur le mannane de *C. albicans*. D'après Mille, C *et al*, 2006

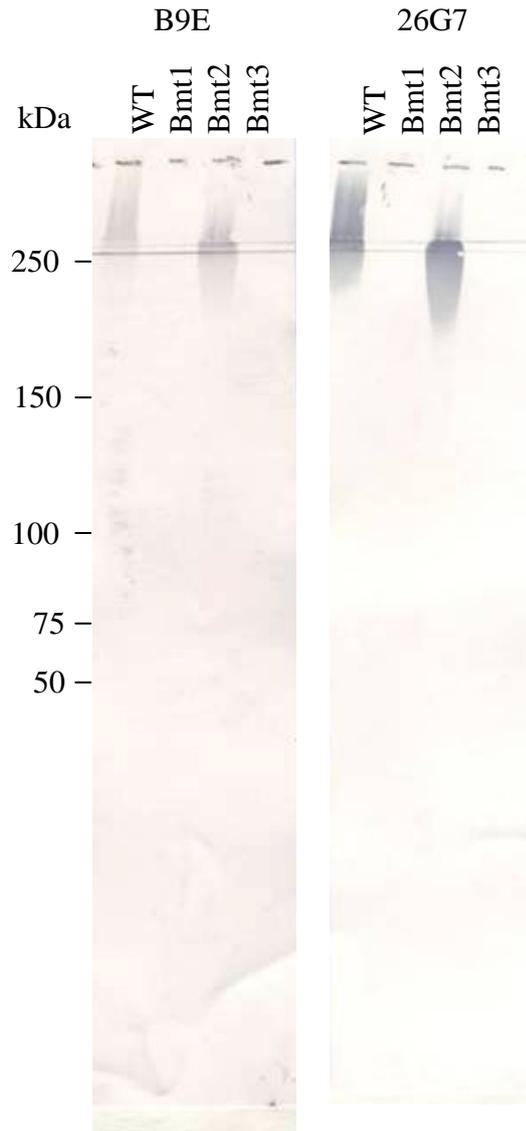


Figure 19 : Les mutants révélés par le mAb B9E (1:1000) et le mAb 26G7 (1:1000) en Western blot

Comme attendu, la souche sauvage est révélée par le B9E et 26G7. Seules les glycoprotéines de Bmt2 sont marquées par ces deux anticorps. Les déterminants antigéniques de Bmt1 et Bmt3 ne sont pas reconnus.

Ainsi, cette série d'expérience a permis d'une part d'évaluer la sensibilité et la spécificité de l'anticorps 26G7 sur un panel de souche et d'autre part de caractériser son épitope. Elles montrent que l'anticorps 26G7 présente les mêmes caractéristiques que l'anticorps B9E ; il reconnaît le même épitope que celui-ci à savoir les  $\beta$ -mannosides présents sur la partie non réductrice des chaînes  $\alpha$ -1,2 (article en préparation).

## II. Evaluation de l'incidence de l'expression des glycanes pariétaux sur la réponse cellulaire de l'hôte (article 4)

La balance entre la production de cytokines de type pro et anti-inflammatoires est cruciale dans l'infection par *C. albicans*. En effet, ces deux profils de régulation sont associés soit à une résistance de l'hôte soit à la dissémination de la levure. La charge fongique est l'un des facteurs les plus importants, directement impliqué dans l'initiation et le devenir des infections.

Le but de ce travail a été d'étudier les effets de différentes charges fongiques dans la modulation de ces deux types de réponses cytokiniques. Pour ce faire, la réponse cellulaire induite par *C. albicans* a été analysée via la sécrétion de TNF- $\alpha$  versus IL-10 sur deux lignées de macrophages murins J774 et RAW.

Les résultats indiquent que *C. albicans* induit la production de TNF- $\alpha$  par les J774 et les RAW. Cette sécrétion de TNF- $\alpha$  est fonction de la charge fongique utilisée. En effet, celle-ci est élevée lorsque le ratio levure-macrophage est de 1L/1M mais est amoindrie lorsque la charge en levure est de 10L/1M. De plus, elle est dépendante de la phosphorylation d'ERK. La viabilité des macrophages vis à vis de ces deux charges fongiques a été évaluée et n'est pas lié avec l'effet observé.

Des blastoconidies traitées au PAF sont incapables de stimuler ou de moduler les réponses cellulaires quelque que soit le ratio levure-macrophage utilisé. Le surnageant obtenu de culture de levure seule à différents ratios (1L ou 10L pour 1M) induit une forte production de TNF- $\alpha$  mais ne module pas la réponse cytokinique. Cependant, le surnageant de co-culture levure-macrophage à charge fongique importante stimule la sécrétion de TNF- $\alpha$  mais en abolit la production. Ainsi, un composé excrété par les levures lors du contact avec les macrophages semble être à l'origine de cette modulation cellulaire.

Deux molécules connues pour être excrétées par les levures, ont été examinées. Le PLM, régulateur négatif de la phosphorylation d'ERK, induit la sécrétion de TNF- $\alpha$  par les cellules. Le farnesol, molécule de quorum sensing impliquée dans le maintien de la forme blastoconidie à une haute densité, ne stimule pas les macrophages. Ces deux composés ne sont pas impliqués dans l'effet suppresseur précédemment observé. En parallèle, la production d'IL-10 a été mesurée. Un effet dose dépendant a été observé uniquement avec des blastoconidies vivantes. Les surnageants de culture de levures ou de

co-culture levure-macrophage ne stimulent pas la sécrétion d'IL-10. De plus, la sécrétion d'IL-10 est indépendante de la phosphorylation ERK.

Ces travaux indiquent que la réponse cytokinique induite par *C. albicans* peut prendre deux orientations différentes. La réponse immune résultante est fonction de la charge fongique, dépendante des interactions entre les différents glycanes de la paroi de *C. albicans* et les récepteurs spécifiques des cellules macrophagiques. De plus, la sécrétion de molécules par les levures lors du contact avec les macrophages semble essentielle dans la modulation de cette réponse. Les mécanismes exacts mis en jeu restent à élucider.

## **ARTICLE 4**

*In vitro* pro- and anti-inflammatory responses to viable *Candida albicans* yeasts by a murine macrophage cell line

## In vitro pro- and anti-inflammatory responses to viable *Candida albicans* yeasts by a murine macrophage cell line

AUORE SARAZIN<sup>\*†</sup>, DANIEL POULAIN<sup>\*†</sup> & THIERRY JOUAULT<sup>\*†</sup>

<sup>\*</sup>Inserm U995 and <sup>†</sup>Université Lille Nord de France, Lille, France

The balance between pro- and anti-inflammatory cytokine production is a crucial aspect of infections caused by *Candida albicans*. We therefore investigated the effect of yeast concentration on the pro- and anti-inflammatory cytokine response. Production of tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) by the murine macrophage cell line J774 decreased significantly as the live yeast concentration increased. In parallel, a dose-dependent production of interleukin-10 (IL-10) was observed with live *C. albicans*. Paraformaldehyde-treated yeasts were unable to stimulate or modulate this response. Yeast culture supernatants induced high levels of TNF- $\alpha$  production when added to the macrophage cells, but did not down-modulate the macrophage response. In contrast, supernatants from yeast-macrophage co-cultures stimulated less TNF- $\alpha$  production and induced a down-modulation of the macrophage response, showing that modulation depended on macrophage- or yeast-derived components secreted when the yeast concentration was high. Phospholipomannan (PLM), but not farnesol, stimulated TNF- $\alpha$  production, but neither PLM nor farnesol down-modulated cytokine production in response to yeasts. Yeast culture supernatants or supernatants from yeast-macrophage co-cultures did not induce IL-10 production. These results suggest that the final macrophage cytokine response is determined by the interplay between live yeasts and macrophages, and that the direction of the response is dependent on the yeast concentration.

**Keywords:** *Candida albicans*, cytokine production, inflammatory response, macrophage, yeast load

### Introduction

*Candida albicans* is the most common fungal pathogen of humans and may also be found as a saprophyte of the oral cavity, vagina, and digestive tract. It is now known that the protective response to fungal exposure is initiated by host recognition of specific pathogen-associated molecular patterns, leading to a pro-inflammatory response [1]. This recognition is based on the expression of components in the yeast cell wall which is a complex and dynamic structure composed of chitin, glucans, mannoproteins, mannan, and glycolipids [2]. Several lectins have been shown to act either

independently or in co-operation with Toll-like receptors (TLRs) or other signaling receptors, to recognize surface sugars of yeasts for induction of the cell response [3]. It is now clear that signaling results in a pro-inflammatory response towards *C. albicans* yeast cells, and that this response is necessary to acquire resistance to infection. However, this response does not seem to be specific to pathogenic microorganisms since both *C. albicans* and the non-pathogenic yeast *Saccharomyces cerevisiae* can induce TLR-dependent pro-inflammatory cytokine production [4,5].

Human candidiasis is associated with increased serum concentrations of interleukin-10 (IL-10) [6], and several reports suggest that IL-10 may facilitate systemic candidiasis. Thus, C57BL/6 mice, which produce lower serum concentrations of IL-4 and IL-10 than Balb/c mice, have been shown to be more resistant to systemic candidiasis. Depletion of IL-10, but not IL-4, in these mice led to *C. albicans* proliferation in the host [7]. *C. albicans* does not cause significant infection in IL-10-deficient mice [8].

Received 10 December 2009; Received in final revised form 22 February 2010; Accepted 10 March 2010

Correspondence: Thierry Jouault, INSERM U995 Team 2, Faculté de Médecine H. Warembourg, Pôle Recherche, Place Verdun, F-59000 Lille, France. Tel: +33 3 20 62 34 15; fax: +33 3 20 62 34 16; E-mail: thierry.jouault@univ-lille2.fr

© 2010 ISHAM

DOI: 10.3109/13693781003767592

Instead, improved yeast clearance, reduced fungal load, and fungal-associated inflammatory responses are observed in IL-10 knock-out (KO) mice, leading to early resistance to systemic candidiasis [9]. The absence of IL-10 allows up-regulation of type 1 cytokine responses in particular, associated with higher production of IL-12 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) [8]. Macrophages can secrete large quantities of IL-10, participate in suppression of the differentiation of Th1- and IL-17-producing T-helper cells, and promote differentiation of Treg cells [10]. Thus, *C. albicans* may be able to induce an anti-inflammatory response favoring progression of infection.

Most systemic *C. albicans* infections are endogenous in origin and are closely related to the fungal concentration in the gastrointestinal tract. An increase in *C. albicans* colonization is an independent risk factor for *Candida* dissemination, and persistent colonization is the most important risk factor for candidemia [11]. Furthermore, the intensity of *Candida* colonization, assessed by systematic screening of several body sites, helps to predict subsequent infection in critically ill patients [12].

This study evaluated pro- and anti-inflammatory cytokine secretion by macrophages in relation to yeast concentration and viability. The early macrophage response appeared to depend on the yeast concentration, with lower TNF- $\alpha$  production and higher IL-10 secretion as the *C. albicans* yeast concentration increased. This effect was specific to live *C. albicans* and involved components secreted during the interaction between yeasts and macrophages.

## Materials and methods

### Yeast strains and growth conditions

*C. albicans* strain SC5314 (serotype A) was used throughout this study, with *S. cerevisiae* strain S288C as the control. Yeast cells were maintained at 4°C on YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) agar, but before each experiment, yeast cells were transferred onto fresh YPD and cultured overnight at 37°C. In some experiments, paraformaldehyde (PFA)-treated yeasts were used for stimulation. For this, live yeasts were fixed with 0.4% PFA in phosphate-buffered saline (PBS) for 30 min and then washed in PBS before use.

### Macrophage cell line

The mouse macrophage cell line, J774 (ECCC 85011428), was derived from a tumor in a female BALB/c mouse. Adherent cells were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Valbiotech,

Paris, France), 5 mM L-glutamine, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and 50  $\mu$ g/ml penicillin. Before use, the cells were gently scraped off with a rubber policeman and inoculated into 24-well tissue culture dishes.

### Production of yeast or yeast-macrophage culture supernatants

Yeast or yeast-macrophage culture supernatants were obtained by incubating *C. albicans* in the presence or absence of 10<sup>6</sup> J774 cells at a yeast:macrophage ratio of 1:1 and 10:1 in 500  $\mu$ l DMEM supplemented with 10% heat-inactivated FCS, 5 mM L-glutamine, 100  $\mu$ g/ml streptomycin, and 50  $\mu$ g/ml penicillin for 4 h at 37°C. After centrifugation to remove yeast cells and macrophages, the supernatants were stored at -20°C.

### *Candida*-derived phospholipomannan and farnesol

*C. albicans* phospholipomannan (PLM) was prepared as described previously [13]. Commercially available farnesol (Sigma, St Louis, MO) was also used in some experiments.

### Assessment of cytokine production by macrophages

J774 cells (10<sup>6</sup> cells/well) were incubated with *C. albicans* yeast cells for 4 h at 37°C at a yeast:macrophage ratio of 1:1, 5:1, or 10:1. For yeast-derived products, different concentrations of farnesol, PLM, or *C. albicans* culture supernatants (100  $\mu$ l of supernatant in 500  $\mu$ l of culture medium/well) were added to the macrophages or yeast + macrophage co-cultures. After incubation, cell-free supernatants were collected and stored at -20°C for cytokine assay. Cytokine concentrations were measured using a commercial ELISA kit according to the manufacturer's instructions (R&D Systems, Minneapolis, MN).

### Macrophage viability

Macrophage viability after incubation with *C. albicans* yeast cells was determined using the Celltiter blue reagent (Promega, Charbonnières-les-Bains, France). Macrophages alone or co-cultured with *C. albicans* at different yeast:macrophage ratios were incubated for 3 h at 37°C. Celltiter blue reagent was then added and incubation was continued for a further 1 h before measurement of the optical density at 550/620 nm. Incubation with Celltiter blue reagent for 1 h gave optimal discrimination between yeast and macrophage metabolism as determined in preliminary experiments consisting of macrophages alone or yeasts alone (at concentrations equivalent to the yeast:macrophage ratios used) incubated with Celltiter blue reagent. At this

time point, yeast metabolism was limited and was significantly lower than macrophage staining.

#### Statistical analysis

All experiments were repeated at least three times. Dose-dependent evaluations were compared by ANOVA or the Student's *t* test for simple comparisons.  $P < 0.05$  was considered to indicate statistical significance.

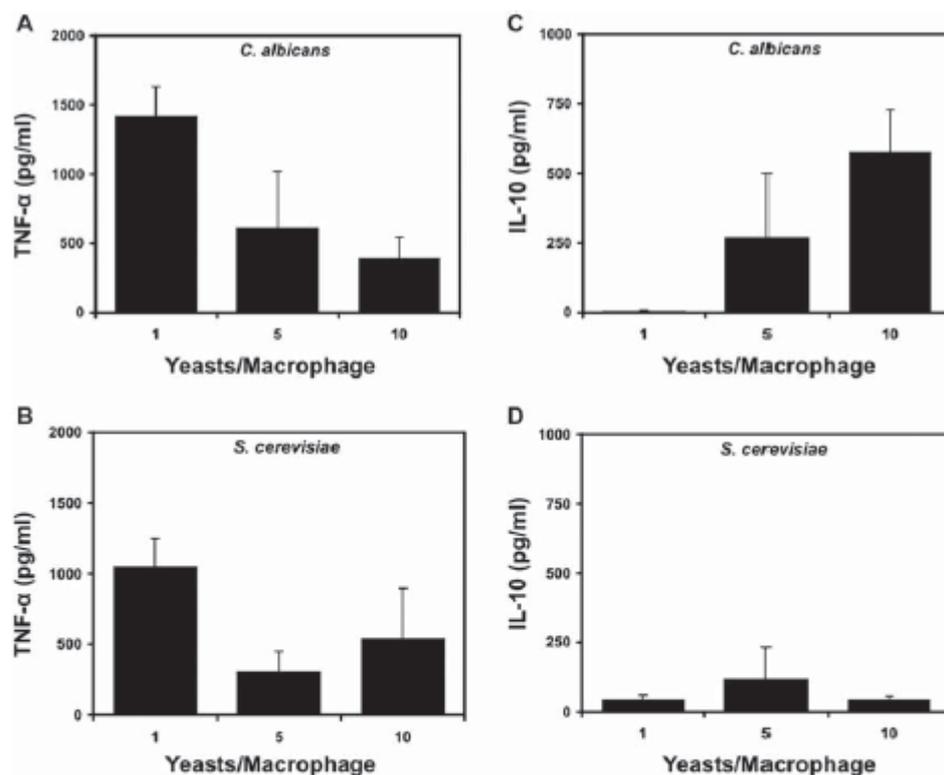
## Results

### Effect of yeast concentration on TNF- $\alpha$ and IL-10 production by J774 cells

When J774 cells were incubated with different concentrations of *C. albicans* yeast cells for 4 h, the macrophages secreted TNF- $\alpha$  (Fig. 1A). This response decreased significantly as the yeast concentration increased ( $P = 0.01$ ).

Significant TNF- $\alpha$  production was also observed with the control strain of *S. cerevisiae* (Fig. 1B), but this latter response was less dependent on the yeast concentration ( $P = 0.056$ ). A high level of IL-10 production was detected after incubation of macrophages with *C. albicans* yeast cells (Fig. 1C). In contrast to TNF- $\alpha$  induction (Fig. 1A), IL-10 secretion was directly related to the concentration of yeasts used for co-culture ( $P = 0.003$ ). No significant IL-10 production was observed with *S. cerevisiae* ( $P > 0.5$ ) (Fig. 1D).

The mean concentrations of TNF- $\alpha$  and IL-10 produced in accord with the yeast:macrophage ratios are shown in Table 1. These data were used to calculate the TNF- $\alpha$ /IL-10 and IL-10/TNF- $\alpha$  ratios observed in each condition. These ratios showed that increasing the yeast concentration 10 times resulted in a 10,000-fold reduction in the pro-inflammatory signal delivered by macrophages and a 2000-fold increase in the anti-inflammatory signal.



**Fig. 1** Cytokine production by J774 macrophage cells in response to live yeast cells J774 cells ( $10^6$ ) were incubated with either *Candida albicans* (A, C) or *Staphylococcus cerevisiae* (B, D) blastoconidia at a yeast:macrophage ratio of 1:1, 5:1, or 10:1. Production of TNF- $\alpha$  (A, B) and IL-10 (C, D) was measured in cell-free supernatants after 4 h at 37°C. Values shown are the means  $\pm$  standard error of three independent experiments performed in triplicate. Significant variations in production according to the concentration of yeasts were determined by ANOVA.

**Table 1** Balance between TNF- $\alpha$  and IL-10 production by macrophages incubated with *Candida albicans* expressed as a pro- (TNF- $\alpha$ /IL-10) or anti- (IL-10/TNF- $\alpha$ ) inflammatory cytokine ratio in relation to yeast:macrophage ratio

	Yeast:macrophage ratio		
	1:1	5:1	10:1
TNF- $\alpha$ (mean value, pg/ml)	1 250	700	400
IL-10 (mean value, pg/ml)	nd	250	700
TNF- $\alpha$ /IL-10 ratio	1 250	2.8	0.6
IL-10/TNF- $\alpha$ ratio	0.0008	0.35	1.75

nd: not detected.

*Decreased TNF- $\alpha$  production by macrophages incubated with C. albicans is not related to induction of macrophage death*

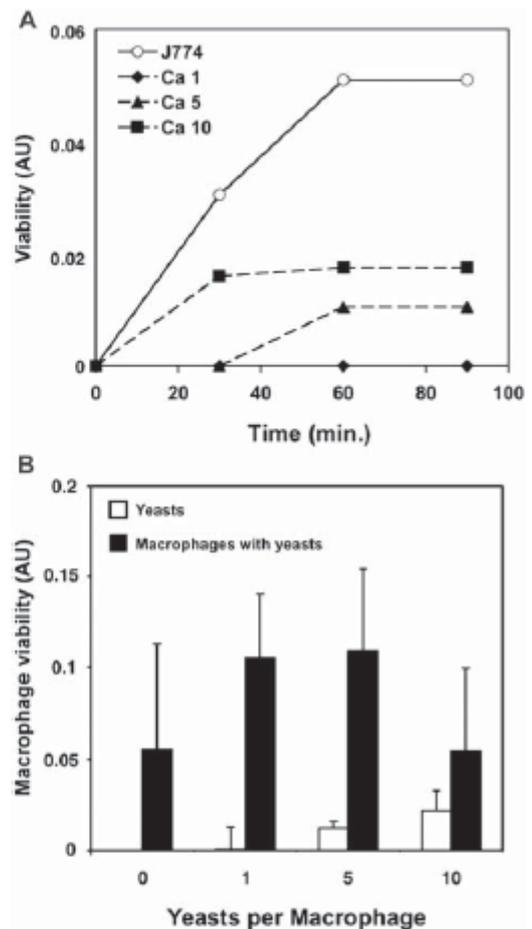
The kinetics of metabolic activity of macrophages differed significantly from those measured with *C. albicans* yeasts alone (Fig. 2A). As noted previously, to assess viability at the time of cytokine measurement (4 h), staining with Celltiter blue reagent for 1 h was performed after 3 h of growth. Measurement of cytokine activity in co-cultures of macrophages and yeasts revealed increased activity in the presence of yeasts compared to macrophages incubated alone (Fig. 2B). This was not dependent on yeast metabolism since at this time only limited staining was observed with yeasts cultured alone. This shows that decreased TNF- $\alpha$  production by macrophages incubated with *C. albicans* was not related to induction of macrophage death. Metabolic activity increased significantly as the yeast concentration increased, except at the highest yeast:macrophage ratio. Furthermore, macrophage death as an explanation for decreased TNF- $\alpha$  production was not compatible with the concomitant increase in IL-10.

*Effect of yeast viability on cytokine production by macrophages*

Stimulation of TNF- $\alpha$  production by macrophages incubated with PFA-treated yeasts was dramatically reduced compared to that observed with live *C. albicans* cells (Fig. 3). However, when high concentrations of PFA-treated yeasts were used for stimulation, a slight decrease in TNF- $\alpha$  production was observed, although this did not reach statistical significance. Inactivation of *C. albicans* with PFA before addition to the macrophages led to complete abolishment of IL-10 production (data not shown).

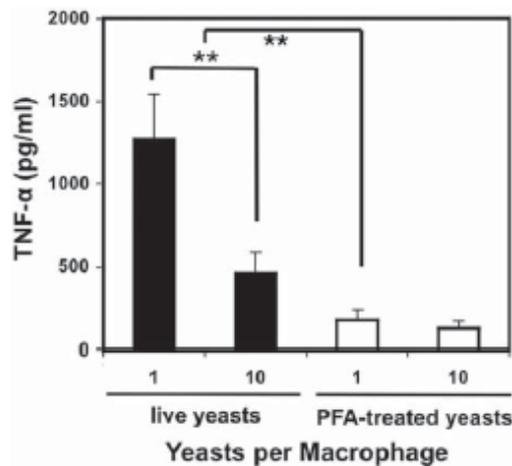
*Modulation of cytokine production by yeast or yeast-macrophage culture supernatants*

The scheme for this experiment is shown in Fig. 4A. Compared to macrophages cultured with live yeast cells (Fig. 4B,



**Fig. 2** Effect of yeast concentration on J774 cell viability. (A) J774 cells alone or different concentrations of yeasts were incubated with Celltiter blue reagent at 37°C for different periods of time. Metabolic activity of the cells and yeasts was determined by measuring absorbance at 550/620 nm. (B) J774 cells were incubated without or with *C. albicans* blastoconidia at a yeast:macrophage ratio of 1:1, 5:1, or 10:1. After 3 h incubation at 37°C, Celltiter blue reagent was added for 1 h and metabolic activity of the cells was determined. The results of triplicate measurements are expressed as AU (Arbitrary Units) calculated by subtracting background absorbance in the absence of macrophages and yeasts from specific absorbance. Values presented are the means  $\pm$  standard error of three independent experiments.

left panel), addition of supernatants from yeasts cultured alone (S1 and S2) to yeast:macrophage co-cultures (1:1 ratio) led to higher levels of TNF- $\alpha$  production by J774 cells. The level of TNF- $\alpha$  production was directly related to the concentration of yeasts used to produce the supernatants (Fig. 4B, right panel, open bars). When the activity of supernatants obtained after co-culture of macrophages



**Fig. 3** Effect of treatment of *Candida albicans* with paraformaldehyde on TNF- $\alpha$  production J774 cells were incubated with live (filled bars) or PFA-treated (open bars) blastoconidia at a yeast:macrophage ratio of 1:1 or 10:1. TNF- $\alpha$  production was measured in cell-free supernatants after 4 h at 37°C. Data shown are the means  $\pm$  standard error of three independent experiments performed in triplicate. \*\* $P < 0.01$ .

with yeasts at a yeast:macrophage ratio of 1:1 and 10:1 (S3 and S4, respectively) was assessed on fresh macrophages (Fig. 4B, right panel, filled bars), both supernatants stimulated significant production of TNF- $\alpha$ . However, when supernatant from yeast:macrophage (10:1) co-cultures (S4) was added to macrophages in the presence of yeasts, TNF- $\alpha$  production decreased (Fig. 4B, right panel, filled bars). No IL-10 secretion was detectable after stimulation with these supernatants (data not shown).

These results suggest that yeast-free supernatants contain fungal components that stimulate TNF- $\alpha$  production, but not components inducing dose-dependent down-regulation. In contrast, supernatants from yeast-macrophage co-cultures contain a stimulus for TNF- $\alpha$  production. However, supernatants from co-cultures with high concentrations of yeasts contain additional products that interfere with macrophage stimulation. This suggests that either live yeasts or macrophages secrete components during yeast-macrophage interaction that are responsible for down-regulation of TNF- $\alpha$  secretion. However, although IL-10 induction by high yeast concentrations was concomitant with decreased TNF- $\alpha$  production (Fig. 4, left panel and Fig. 1), no significant IL-10 production by macrophages stimulated with such supernatants was observed.

#### Effect of farnesol on cytokine production by macrophages

Farnesol itself, even at high concentrations, did not induce significant TNF- $\alpha$  or IL-10 production (Fig. 5A, B, open

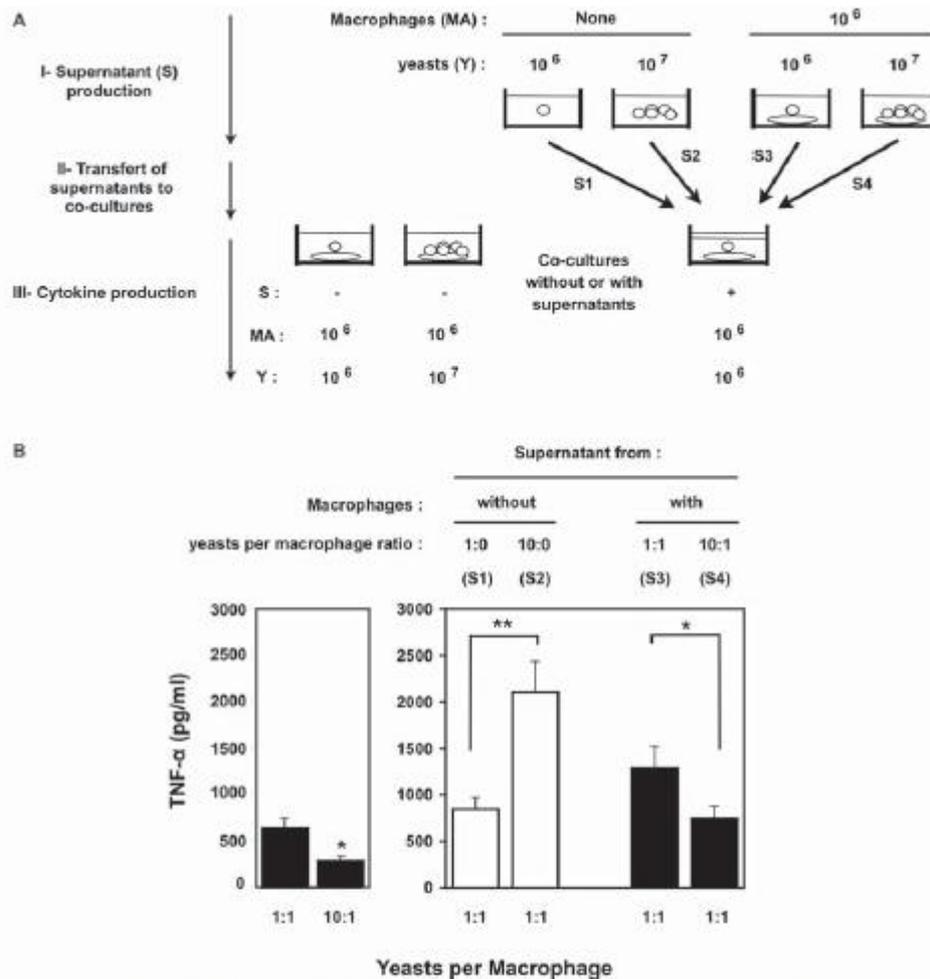
bars). Addition of farnesol to yeast-macrophage co-cultures at a yeast:macrophage ratio of 1:1 did not decrease yeast-induced TNF- $\alpha$  production, irrespective of the concentration of farnesol used (Fig. 5A, filled bars). Similarly, addition of farnesol to these co-cultures did not result in significant enhancement of IL-10 production compared to co-cultures in the absence of farnesol (Fig. 5B, filled bars). Thus, farnesol does not appear to be involved in the induction of TNF- $\alpha$  secretion or in the down-regulation of TNF- $\alpha$  production by macrophages observed with yeasts or supernatants at high fungal concentrations.

#### Modulation of cytokine production by phospholipomannan

As described previously [14], PLM induced a dose-dependent production of TNF- $\alpha$  when added directly to macrophages. The maximum effect was observed when macrophages were incubated with 25  $\mu$ g/ml PLM (Fig. 6A). To examine whether addition of PLM to co-cultures could mimic the effect of high yeast load on the macrophage response, PLM was added together with different concentrations of yeasts to the macrophages. As shown in Fig. 6B, production of TNF- $\alpha$  increased when PLM was added to the macrophages in the presence of yeasts (at a yeast:macrophage ratio of 5:1). Thus, as with yeast-free supernatants, addition of purified PLM led to the increased production of TNF- $\alpha$  by macrophages in the presence of yeasts, without any down-modulation of stimulation. In these conditions, no induction of IL-10 production was observed (data not shown).

## Discussion

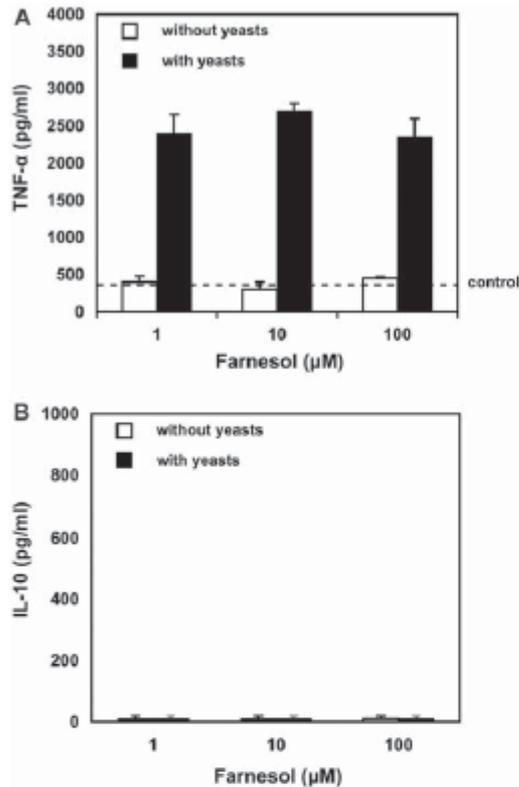
The early interaction between *C. albicans* yeast cells and macrophages has been investigated in studies of the ability of this yeast to generate signaling cascades leading to various effector functions that make up the initial immune response. Most prior studies have been based on measurement of the pro-inflammatory response by targeted cells [1,2,15]. However, several investigations have indicated that a balance between pro- and anti-inflammatory responses during the initial interaction between yeasts and immune cells is necessary for the yeast to establish infection [1]. This was highlighted using IL-10 KO mice where infected mice were found to be more resistant to infection than wild-type mice [8,16]. Conversely, in the gastrointestinal model of infection, exogenous IL-4 and IL-10 were found to exacerbate the course of infection [17], and an overall suppressive role of IL-10 on human monocyte function against *C. albicans* was also demonstrated [18]. These observations revealed a fundamental role for IL-10 in the initial development of *Candida* infection, and suggested that this yeast has a role in stimulating the production of this cytokine.



**Fig. 4** Effect of yeast supernatants on TNF- $\alpha$  production. (A) Scheme used for the experiments. S1, S2, S3, S4: supernatants (S) obtained under the different experimental conditions; (M): macrophages; (Y): yeasts. Each experiment was performed in 500  $\mu$ l culture medium. (B) TNF- $\alpha$  production under the different conditions depicted in (A). Left panel: J774 macrophages were cultured for 4 h with live yeasts at a yeast:macrophage ratio of 1:1 or 10:1. Right panel: J774 cells were incubated with yeasts at a yeast:macrophage ratio of 1:1 in the presence of supernatants from yeasts cultured in the absence (S1, S2) (open bars) or presence (S3, S4) of macrophages (filled bars) at a yeast:macrophage ratio of 1:1 (S1, S3) or 10:1 (S2, S4). Results are the means  $\pm$  standard error of triplicate determinations of one experiment, representative of three independent experiments. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

The current study examined the effect of *C. albicans* concentration on the pro-inflammatory response of macrophages during the initial interaction with these immune cells. Fungal load and persistent colonization have been shown to be important risk factors for candidemia [11]. However, few studies have investigated the early interaction between macrophages and yeasts. Most studies have reported the effect of fixed or dead yeasts after long-term culture. In this investigation, we used live or dead *C. albi-*

*cans*, the non-pathogenic genetically-related yeast *S. cerevisiae*, yeast supernatants, and yeast-derived components. The macrophage response was found to differ depending on the live yeast concentration; thus, the higher the concentration of yeasts interacting with the macrophages the lower the pro-inflammatory response induced. It therefore appears that when a small number of yeasts interact with macrophages, the response is preferentially oriented towards a pro-inflammatory response. This situation is reversed

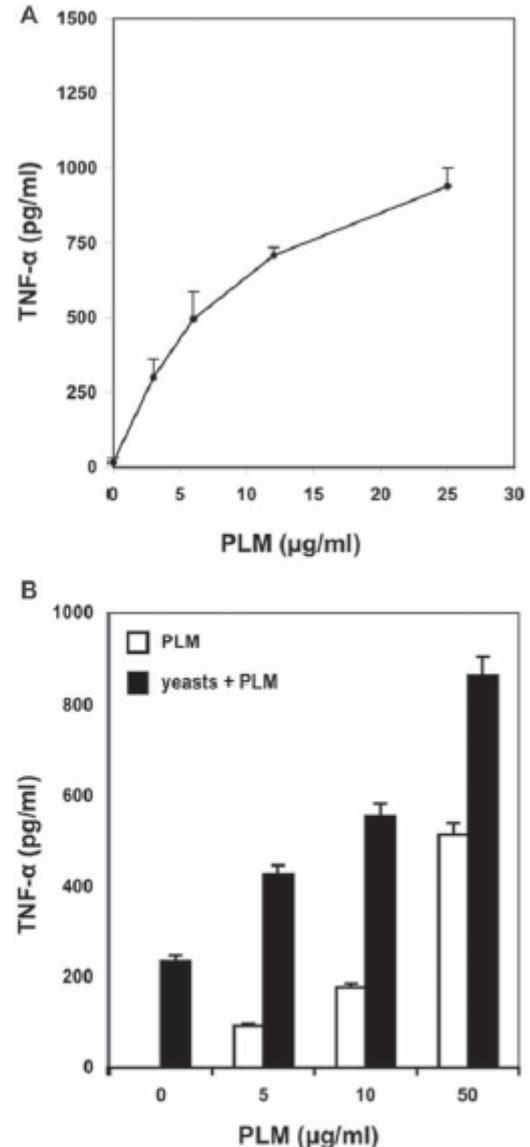


**Fig. 5** Effect of farnesol on TNF- $\alpha$  production by macrophages. J774 cells were incubated with different concentrations of farnesol (1, 10 and 100  $\mu$ M) in the absence (open bars) or presence (filled bars) of yeasts at a yeast:macrophage ratio of 1:1. TNF- $\alpha$  (A) and IL-10 (B) production were measured in cell-free supernatants after 4 h at 37°C. Results are the means  $\pm$  standard error of triplicate determinations of one experiment, representative of three independent experiments.

when a large number of yeasts interact with macrophages, leading to a decreased pro-inflammatory response.

TNF- $\alpha$ /IL-10 and IL-10/TNF- $\alpha$  ratios have been proposed as a means to evaluate trends in pro- or anti-inflammatory responses resulting from the interaction between microorganisms and host cells [19]. Calculation of these ratios in our study showed that a 10-fold increase in yeast concentration resulted in a 10,000-fold reduction in pro-inflammatory signal delivered by macrophages and a 2000-fold increase in the anti-inflammatory signal (Table 1). The balance between these two responses is therefore likely to have a dramatic effect on the surrounding immune cells that receive a signal from macrophages depending on the number of live yeasts with which there are in contact. These results agree with our current knowledge of the pathophysiology of *C. albicans* infection, since increased

© 2010 ISHAM, *Medical Mycology*, Early Online, 1–10



**Fig. 6** Effect of purified phospholipomannan (PLM) on TNF- $\alpha$  production by macrophages. (A) J774 cells were incubated with different concentrations of purified PLM. (B) Different concentrations of purified PLM were added to macrophages alone (open bars) or to yeast-macrophage co-cultures at a yeast:macrophage ratio of 5:1 (filled bars). The results are the means of triplicate determinations of TNF- $\alpha$  production in one experiment, representative of three independent experiments.

gut colonization is generally observed before proceeding to infection [12].

To determine the mechanism of cytokine modulation by *C. albicans* according to fungal concentration, different hypo-

theses were explored. First, *C. albicans* readily produces hyphae, and the contribution of hyphal production to the higher virulence of *C. albicans* compared to other *Candida* species has been investigated. Clearly, switching from the yeast form to the hyphal form is a critical factor enabling *C. albicans* to escape from macrophages after phagocytosis [20] and triggering different cytokine responses in the host, balancing inflammation and tolerance [21]. However, in the current study hyphal transformation is unlikely to have had much influence. First, we studied the early stages of cytokine induction, a process which starts at the initial contact between macrophages and yeasts and results in TNF- $\alpha$  secretion. During preliminary experiments, microscopic examination of cultures revealed only limited hyphal transformation at the end of the incubation period chosen. Thus, hyphae cannot be considered as the primary triggers for cytokine production. As early as 1 h after contact between yeasts and macrophages, differential cytokine production (although at lower levels) was observed that depended on the yeast concentration (data not shown). These arguments are reinforced by experiments conducted with the aegerminative *C. albicans* mutant EFG1-/- [22], in which yeast concentration had an identical effect on the regulation of cytokine production by macrophages (unpublished data). Second, at the critical yeast concentrations ( $>5 \times 10^6$ /ml) where down-regulation of TNF- $\alpha$  and up-regulation of IL-10 were observed, it has been well established that the *C. albicans* filamentation rate is concentration dependent [23,24]. This observation was confirmed under our experimental conditions where, at a 10:1 ratio (corresponding to a yeast concentration of  $2.5 \times 10^7$  yeasts/ml), *C. albicans* was unable to produce germ tubes.

A possible role of macrophage death was also investigated since a previous study showed that induction of apoptosis depended on modulation of signaling induced by PLM during phagocytosis [25]. We found no significant change in macrophage metabolism at the time of TNF- $\alpha$  production, thus down-regulation of TNF- $\alpha$  secretion could not be related to the direct effect of *C. albicans* on macrophage death.

We also investigated whether treatment of *C. albicans* yeasts with PFA affected the ability of the yeast cells to stimulate macrophages. PFA treatment results in only minor alterations of yeast integrity, as determined by cytometric analysis of glycan expression at the yeast surface (data not shown and refs [26,27]). Only limited stimulation of macrophages by PFA-treated yeasts was observed, indicating that interaction between the integral yeast cell wall and macrophages was not sufficient for stimulation. This differs from previous studies which reported that TNF- $\alpha$  could be induced by PFA-fixed yeasts [28]. However, in these earlier investigations, cytokine production was measured after 24 h incubation, allowing sufficient time for TNF- $\alpha$  to accumulate, even if cytokine secretion was

limited in the early stages of the interaction. Thus, it appears that yeast viability is necessary for the macrophage response in the early stages of interaction.

Several studies have indicated that *C. albicans* components shed from the yeasts are able to modulate macrophage activity [29–31]. This was confirmed in the current investigation in that supernatants from yeasts cultured alone were able to stimulate dose-dependent production of pro-inflammatory cytokines by macrophages, either directly or when co-cultured with yeasts. Yeast-free supernatants may contain several secreted products including farnesol. Farnesol is a quorum-sensing molecule that is actively released by *C. albicans* yeasts during growth, accumulates in stationary-phase yeasts, and inhibits hyphal formation [32]. Farnesol has been shown to interfere with signaling involving TLR2 [33] and with anti-*Candida* activity through induction of oxidative stress [34]. These observations suggest a possible role of this quorum-sensing molecule in modulation of the macrophage response. In the current study, farnesol did not stimulate TNF- $\alpha$  production when added directly to the macrophages. Therefore, although farnesol may modulate TLR2 expression, it does not modulate the downstream cell response leading to early TNF- $\alpha$  production. Moreover, addition of farnesol to yeast-macrophage co-cultures at low ratios in order to evaluate its possible additional role in modulating the macrophage response, did not lead to a significant difference in the macrophage response to yeasts, regardless of the concentration used. Thus, farnesol does not appear to be involved in the process leading to modulation of the pro-inflammatory response observed with live yeasts.

As described previously [14,35], purified PLM stimulated TNF- $\alpha$  production when added directly to macrophages, with similar kinetics to yeasts alone. Addition of PLM to macrophages co-cultured with yeasts did not alter TNF- $\alpha$  production in this study. Thus, although PLM was shed from the yeast cells and interacted with macrophages, it only stimulated the pro-inflammatory cell response early in this interaction. These results, which confirm previous studies, demonstrate that dysregulation of cell signaling observed after incubation of macrophages with PLM [25] was not involved in the alteration of TNF- $\alpha$  production observed in the present study.

Supernatants from yeast-macrophage co-cultures, but not from yeasts cultured alone, were able to down-regulate the pro-inflammatory response. This suggests a role for macrophages in modulation of TNF- $\alpha$  production during the interaction between macrophages and high yeast concentrations. The macrophage response in the presence of high yeast concentrations was investigated to measure induction of the anti-inflammatory cytokine, IL-10, one of the most important cytokines able to regulate the TNF- $\alpha$  secretory response. As fungal concentration increased and TNF- $\alpha$  production decreased, dose-dependent secretion of IL-10 was

observed when macrophages were cultured with *C. albicans*. This stimulation was dependent on live yeasts since PFA-treated yeasts were unable to significantly stimulate or down-regulate cytokine production.

No significant induction of IL-10 or down-regulation of TNF- $\alpha$  production was observed when yeast supernatants were added to macrophages. Similarly, PLM and farnesol were unable to down-modulate TNF- $\alpha$  production and induce IL-10 secretion. In contrast, supernatants from yeast-macrophage co-cultures decreased the TNF- $\alpha$  response to yeasts when added to fresh macrophages, showing that the inhibitory activity was dependent on the interaction of live yeasts with macrophages. However, no significant induction of IL-10 was observed with these yeast products. Therefore, although it appeared that decreasing TNF- $\alpha$  production was associated with increasing IL-10 secretion, a direct link between the two was difficult to establish.

Together, these results suggest a role for a macrophage- or yeast-dependent product processed by macrophages in the mechanism involved in modulation of TNF- $\alpha$  secretion, allowing macrophages to produce anti-inflammatory cytokines. Interestingly, the presence of an as yet uncharacterized component balancing the pro- and anti-inflammatory cytokine response has been reported in supernatants from macrophages interacting with *C. albicans* biofilms [36]. Although biofilm formation was not observed in our study, the fact that a high fungal concentration was necessary for down-regulation of the pro-inflammatory response suggests similarity between the two mechanisms. Experiments are in progress to characterize these soluble factors and to determine their regulatory activity on cell signaling leading to down-regulation of the pro-inflammatory response.

In conclusion, high concentrations of live *C. albicans* yeast cells are able to modify the macrophage response. At low concentrations, as during the commensal state, *C. albicans* can stimulate the pro-inflammatory response through shedding of cell components such as PLM. Conversely, TNF- $\alpha$  production is inhibited when high yeast concentrations interact with macrophages. These findings suggest a novel way that *C. albicans* may modify the immune response, modulating the Th1 protective immune response and favoring an anti-inflammatory response that allows infection to proceed.

### Acknowledgements

Aurore Sarazin was supported by a grant from INSERM/Région Nord-Pas de Calais.

The authors thank Boualem Sendid for his helpful suggestions and his assistance in writing this manuscript.

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

### References

- Jouault T, Sarazin A, Martinez-Esparza M, *et al.* Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. *Cell Microbiol* 2009; **11**: 1007–1015.
- Poulain D, Jouault T. *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol* 2004; **7**: 342–349.
- Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll-like receptor 2. *J Exp Med* 2003; **197**: 1107–1117.
- Netea MG, van der Graaf C, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens: bringing specificity to the innate-immune system. *J Leukoc Biol* 2004; **75**: 749–755.
- Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, *et al.* Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol* 2004; **42**: 485–498.
- Roilides E, Sein T, Schaufele R, Chanock SJ, Walsh TJ. Increased serum concentrations of interleukin-10 in patients with hepatosplenic candidiasis. *J Infect Dis* 1998; **178**: 589–592.
- Tavares D, Ferreira P, Arala-Chaves M. Increased resistance to systemic candidiasis in athymic or interleukin-10-depleted mice. *J Infect Dis* 2000; **182**: 266–273.
- Del Sero G, Mencacci A, Cenci E, *et al.* Antifungal type 1 responses are upregulated in IL-10-deficient mice. *Microbes Infect* 1999; **1**: 1169–1180.
- Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Wagner RD, Warner T, Balish E. Early resistance of interleukin-10 knockout mice to acute systemic candidiasis. *Infect Immun* 1999; **67**: 670–674.
- Denning TL, Wang YC, Patel SR, Williams IR, Palendran B. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol* 2007; **8**: 1086–1094.
- Jordá-Marcos R, Alvarez-Lerma F, Jurado M, *et al.* Risk factors for candidaemia in critically ill patients: a prospective surveillance study. *Mycoses* 2007; **50**: 302–310.
- Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg* 1994; **220**: 751–758.
- Trinel PA, Maes E, Zanetta JP, *et al.* *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *J Biol Chem* 2002; **277**: 37260–37271.
- Jouault T, Ibatá-Ombetta S, Takeuchi O, *et al.* *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis* 2003; **188**: 165–172.
- Netea M, Brown G, Kullberg B, Gow N. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Micro* 2008; **6**: 67–78.
- Romani L, Puccetti P, Mencacci A, *et al.* Neutralization of IL-10 up-regulates nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *Candida albicans*. *J Immunol* 1994; **152**: 3514–3521.
- Tonnetti L, Spaccapelo R, Cenci E, *et al.* Interleukin-4 and -10 exacerbate candidiasis in mice. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 1559–1565.
- Roilides E, Anastasiou-Katsiardani A, Dimitriadou-Georgiadou A, *et al.* Suppressive effects of interleukin-10 on human mononuclear phagocyte function against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1998; **178**: 1734–1742.
- Gogos C, Drosou E, Bassaris H, Skoutelis A. Pro- versus anti-inflammatory cytokine profile in patients with severe sepsis: a marker for

- prognosis and future therapeutic options. *J Infect Dis* 2000; **181**: 176–180.
- 20 Gosh S, Navarathna D, Roberts D, et al. Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line Raw 264.7. *Infect Immun* 2009; **77**: 1596–1605.
  - 21 Bonifazi P, Zelante T, D'Angelo C, et al. Balancing inflammation and tolerance in vivo through dendritic cells by the commensal *Candida albicans*. *Mucosal Immunol* 2009; **2**: 362–374.
  - 22 Stoldt VR, Sonneborn A, Leuker CE, Ernst JF. Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *Candida albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *Embo J* 1997; **16**: 1982–1991.
  - 23 Kruppa M. Quorum sensing and *Candida albicans*. *Mycoses* 2009; **52**: 1–10.
  - 24 Mackenzie DWR. Serum tube identification of *Candida albicans*. *J Clin Path* 1962; **15**: 563–565.
  - 25 Ibat-Ombetta S, Idziorek T, Trinel PA, Poulain D, Jouault T. *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J Biol Chem* 2003; **278**: 13086–13093.
  - 26 Martínez-Esparza M, Sarazin A, Jouy N, Poulain D, Jouault T. Comparative analysis of cell wall surface glycan expression in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2006; **314**: 90–102.
  - 27 Martínez-Esparza M, Sarazin A, Poulain D, Jouault T. A method for examining glycans surface expression of yeasts by flow cytometry. *Methods Mol Biol* 2009; **470**: 85–94.
  - 28 Murciano C, Yanez A, Gil ML, Gozalbo D. Both viable and killed *Candida albicans* cells induce in vitro production of TNF-alpha and IFN-gamma in murine cells through a TLR2-dependent signalling. *Eur Cytokine Netw* 2007; **18**: 33–37.
  - 29 Alem MA, Oteef MD, Flowers TH, Douglas LJ. Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development. *Eukaryotic Cell* 2006; **5**: 1770–1779.
  - 30 Jouault T, Fradin C, Trinel PA, Bernigaud A, Poulain D. Early signal transduction induced by *Candida albicans* in macrophages through shedding of a glycolipid. *J Infect Dis* 1998; **178**: 792–802.
  - 31 Wang M, Mukherjee PK, Chandra J, et al. Characterization and partial purification of *Candida albicans* Secretory IL-12 Inhibitory Factor. *BMC Microbiol* 2008; **8**: 31.
  - 32 Hornby JM, Jensen EC, Lisee AD, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* 2001; **67**: 2982–2992.
  - 33 Décanis N, Savignac K, Rouabhia M. Farnesol promotes epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptor 2 expression, interleukin-6 and human beta-defensin 2 production. *Cytokine* 2009; **45**: 132–140.
  - 34 Abe S, Tsunashima R, Iijima R, et al. Suppression of anti-*Candida* activity of macrophages by a quorum-sensing molecule, farnesol, through induction of oxidative stress. *Microbiol Immunol* 2009; **53**: 323–330.
  - 35 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.
  - 36 Chandra J, McCormick TS, Imanura Y, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Interaction of *Candida albicans* with adherent human peripheral blood mononuclear cells increases *C. albicans* biofilm formation and results in differential expression of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infect Immun* 2007; **75**: 2612–2620.

This paper was first published online on Early Online on 03 May 2010

## Résultats complémentaires de l'article

### Implication d'ERK dans la production de TNF- $\alpha$ induite par *C. albicans*

Les cellules ont été traitées avec un inhibiteur de MEK, altérant la phosphorylation d'ERK avant stimulation par les levures. La production de TNF- $\alpha$  et d'IL10 a été quantifiée après 4h de co-culture avec différentes proportions de levures (Fig 20).

Comme indiqué en fig X, l'addition de cet inhibiteur à une co-culture levure-macrophage, conduit à l'inhibition de la production de TNF- $\alpha$  mais pas à celle d'IL10. De ce fait, la production de TNF- $\alpha$  induite par *C. albicans* est dépendante de la phosphorylation d'ERK.

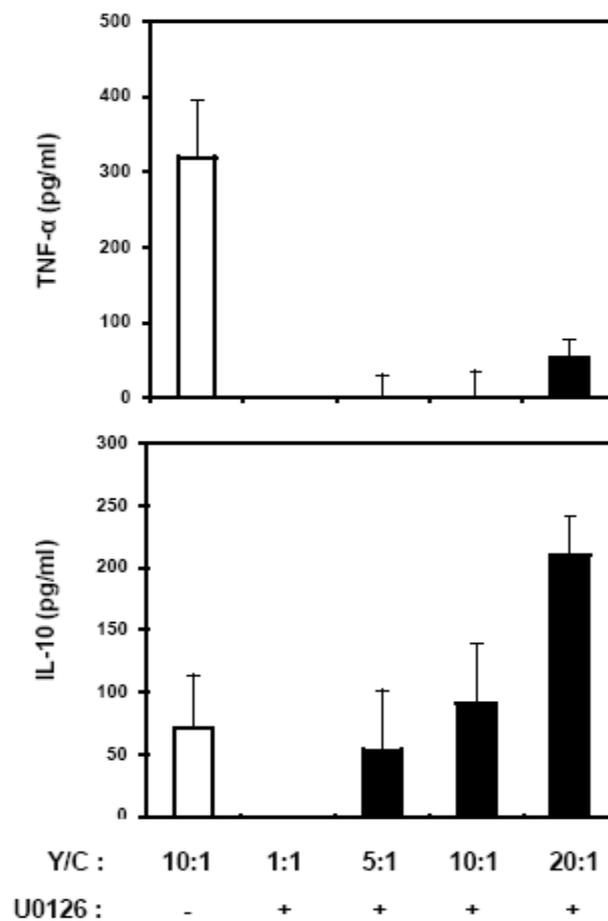


Figure 20 : Effet de l'inhibiteur de MEK (U0126) sur la production de cytokines par les J774 après stimulation par *C. albicans* en différentes proportions.

### III. Rôle des glycanes de la paroi de *C. albicans* dans l'orientation de la réponse immune

Les interactions entre les différents glycanes de la paroi de *C. albicans* et les récepteurs spécifiques des cellules macrophagiques sont importantes dans l'orientation de la réponse immune et donc dans la susceptibilité de l'hôte à l'infection. Cependant, la(es) fonction(s) exacte(s) de chacun de ces glycanes dans l'induction et dans la régulation de la réponse cellulaire n'est (sont) pas clairement identifiée(s).

Afin d'examiner le rôle relatif des différents glycanes pariétaux de *C. albicans* dans l'interaction avec les cellules macrophagiques, un modèle cellulaire a été mis au point. Le modèle développé repose sur l'utilisation de levures vivantes qui après traitement chimique, présentent différents niveaux d'expression des glycanes pariétaux tout en préservant leurs activités biologiques. L'expression des  $\beta$ -mannosides et des  $\beta$ -glucanes de ces différents éléments a été analysée par cytométrie de flux (Fig 20).

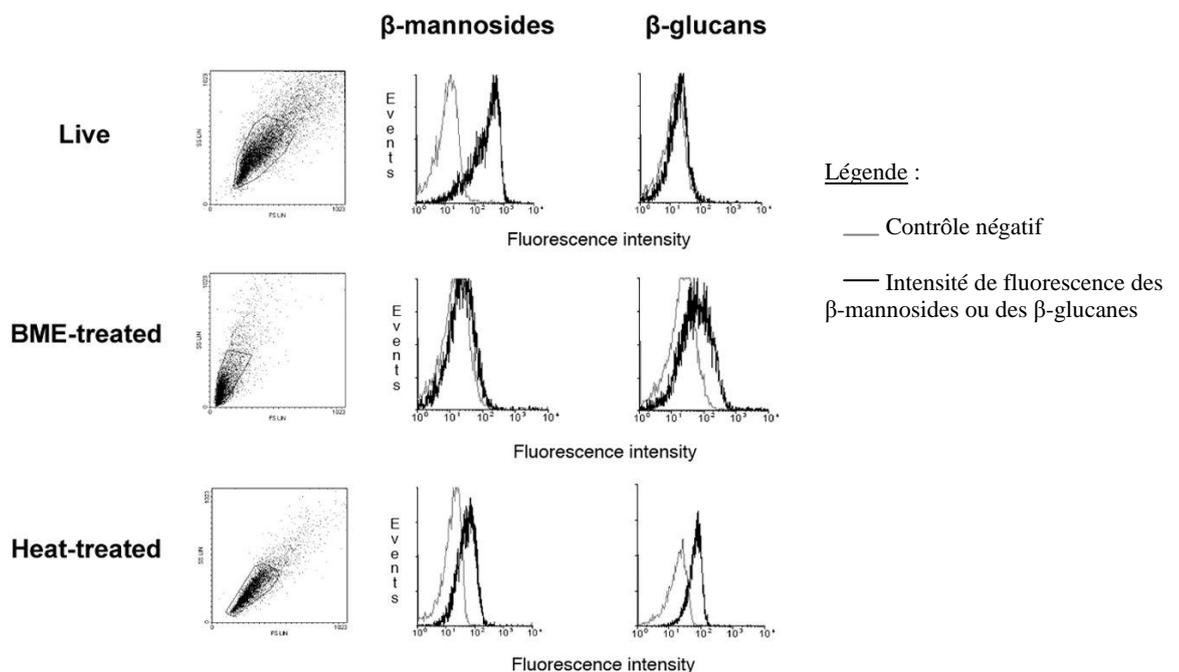


Figure 20 : Expression glycanique de surface des  $\beta$ -mannosides et des  $\beta$ -glucanes de *C. albicans*, *C. albicans* traités au  $\beta$ -mercaptoéthanol et *C. albicans* tués à la chaleur.

A gauche : Dot plot des cellules avec en abscisse la taille (SSC) et en ordonnée la granulométrie (FSC).  
A droite : Histogrammes de fluorescence des cellules.

Contrairement aux levures vivantes, les blastoconidies traitées au  $\beta$ -mercaptoéthanol n'expriment pas de  $\beta$ -mannosides et peu de  $\beta$ -glucanes. Le mannane a été endommagé par le traitement au  $\beta$ -mercaptoéthanol. Les levures tuées à la chaleur présentent des  $\beta$ -mannosides et exposent une forte quantité de  $\beta$ -glucanes.

Ces différents modèles ont été mis en contact avec les cellules macrophagiques J774 en proportion 10 levures pour 1 macrophage. La production de cytokine de type pro et anti-inflammatoire a été évaluée après 4h de co-culture (Fig 21).

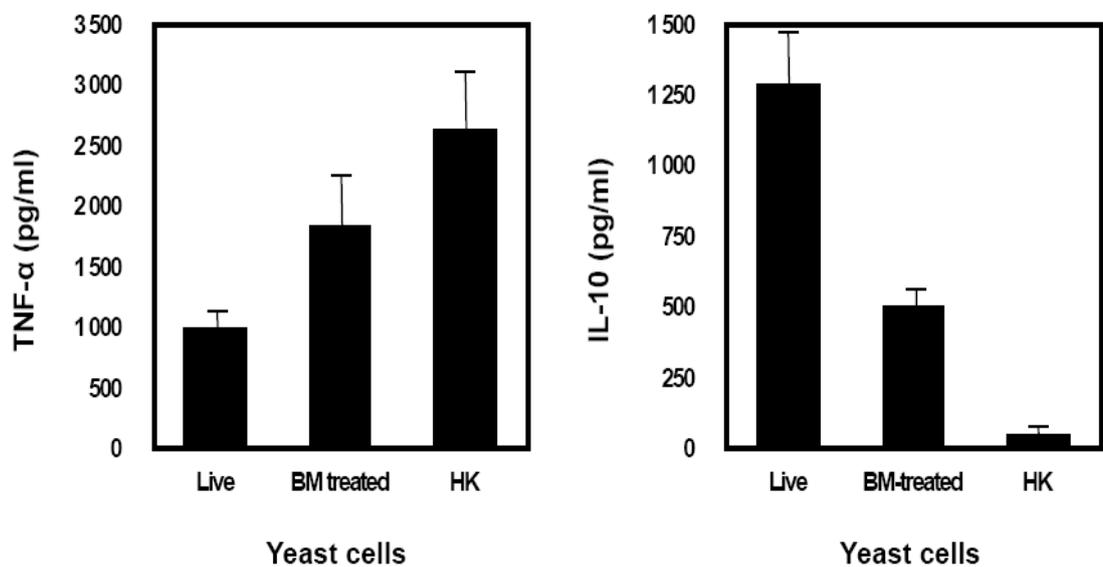


Fig 21 : Production de cytokines par les J774 vis-à-vis de *C. albicans*, *C. albicans* traités au  $\beta$ -mercaptoéthanol et *C. albicans* tués à la chaleur.

Les résultats indiquent que *C. albicans* induit la sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-10. Les blastoconidies tuées à la chaleur conduisent à une forte sécrétion de TNF- $\alpha$  et peu d'IL-10. Les levures traitées au  $\beta$ -mercaptoéthanol, quand à elle, stimulent les macrophages à des taux de sécrétion intermédiaires en TNF- $\alpha$  et en IL-10.

La capacité de *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. albicans* traités au  $\beta$ -mercaptoéthanol et *C. albicans* tués à la chaleur à résister à la phagocytose par les macrophages, a été examinée. Suite à 4h d'incubation avec les macrophages, 1000 levures endocytées sont mises en culture. Après 24h d'incubation, le nombre de CFU est déterminé (Fig 22).

Levures	Macrophages	
	sans contact	après contact
<i>S. cerevisiae</i>	781 +/-151	nd
<i>C. albicans</i>	914 +/-99	659 +/-119
<i>C. albicans</i> traités au BME	616 +/-78	224 +/-12
<i>C. albicans</i> tués à la chaleur	nd	nd

Fig 22 : Viabilité de *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. albicans* traités au  $\beta$ -mercaptoéthanol et *C. albicans* tués à la chaleur après 4h de culture sans ou avec macrophages.

Comparé aux levures n'ayant subi aucun traitement, la viabilité des blastoconidies traitées au  $\beta$ -mercaptoéthanol est diminuée en l'absence de macrophage. Leur capacité à résister à la lyse par les phagocytes est altérée. En ce qui concerne les levures tuées à la chaleur, aucune colonie n'a été observée avec ou sans incubation avec les cellules macrophagiques.

Cette étude montre que les levures vivantes et possédant une paroi complète induisent principalement une réponse de type anti-inflammatoire associée à une résistance à lyse par les macrophages. Alors que les levures exposant des  $\beta$ -glucanes stimulent les cellules à produire une forte quantité de cytokine pro-inflammatoire mais ont une survie limitée dans le phagosome.

Ainsi, les blastoconidies tuées à la chaleur, exposant le plus de  $\beta$ -glucanes, représentent le meilleur stimulus pour l'obtention d'une réponse pro-inflammatoire. Inversement, les levures vivantes, exprimant un taux élevé de  $\beta$ -mannosides (mannanes et mannoprotéines) sont impliquées dans une orientation immune de type anti-inflammatoire. Les glycannes pariétaux fongiques présents à la surface de la paroi notamment le mannane sont ainsi directement impliqués dans la modulation et l'orientation de la réponse inflammatoire. De plus, les modifications d'expression de ces glycannes de surface de *C. albicans*, dépendantes des conditions environnementales, pourraient constituer un nouveau mécanisme d'échappement aux cellules macrophagiques.

#### IV. Rôle de la phagocytose dans l'induction de l'expression des glycannes pariétaux de levures

*C. albicans* doit faire face à des changements de pH et à de nombreuses substances microbicides (protéases, dérivés actifs de l'oxygène et enzymes lysosomiales) à l'intérieur du phagosome. Comme précédemment observé, la charge fongique ainsi que la présence/l'accessibilité de certains glycannes de la paroi sont des facteurs importants dans l'orientation de la réponse immune.

La résistance à la lyse de *C. albicans* et de *S. cerevisiae* lors de la phagocytose en fonction du ratio levure-macrophage a été examinée. En parallèle, l'expression glycanique de surface des levures endocytées a été évaluée.

Deux charges différentes de *C. albicans* ou de *S. cerevisiae*, 1L/1M ou 10L/1M, sont mises en contact pendant 4 heures avec les cellules macrophagiques (J774 ou RAW). Suite à l'incubation, les levures endocytées sont prélevées et comptées. 100 levures sont ensemencées sur milieu SDA solide et incubées une nuit à 37°C. Le lendemain, les colonies sont dénombrées et un pourcentage de viabilité est déterminé (Fig 23).

	% de Colonies
1 <i>C. albicans</i> / 1 macrophage	22 (+/-5)
10 <i>C. albicans</i> / 1 macrophage	87(+/-4)
1 <i>S. cerevisiae</i> / 1 macrophage	1 (+/-1)
10 <i>S. cerevisiae</i> / 1 macrophage	0

Figure 23 : Dénombrement des colonies de *C. albicans* ou de *S. cerevisiae* après 4 heures d'incubation avec les macrophages.

Ces expériences montrent que la résistance de *C. albicans* à la lyse est fonction de la charge fongique. En effet, à un ratio levure-macrophage égal, l'efficacité de phagocytose est élevée et la levure est éliminée. Cependant, à un ratio levure-macrophage de 10L/1M, les levures résistent mieux à la lyse. Aucune colonie n'a été dénombrée pour *S. cerevisiae* quelque soit le ratio levure/macrophage.

Parallèlement, l'expression glycanne de surface des levures endocytées a été analysée par cytométrie en flux selon les proportions de levures mises en contact avec les macrophages (Fig 24 et 25).

A

% de cellules positives <i>C. albicans</i>	$\alpha$ -1,2 mannosides	$\beta$ -mannosides	$\beta$ -mannosides sur la partie non réductrice des chaînes $\alpha$ -1,2	$\beta$ -1,3- glucanes	Chitine
Avant mise en contact	97 (+/-3)	93,4 (+/-8)	73,4 (+/-15)	2,6 (+/-1)	0,6 (+/-1)
1 Levure/1 macrophage	76,4 (+/-21)	79,8 (+/-14)	<b>29 (+/-15)</b>	<b>42,7 (+/-7)</b>	5,4 (+/-3)
10 Levures/1 macrophage	98,8 (+/-2)	91 (+/-6)	91,6 (+/-8)	6 (+/-1)	0,6 (+/-1)

B

MFI <i>C. albicans</i>	$\alpha$ -1,2 mannosides	$\beta$ -mannosides	$\beta$ -mannosides sur la partie non réductrice des chaînes $\alpha$ -1,2	$\beta$ -1,3- glucanes	Chitine
Avant mise en contact	107,6 (+/-27)	130,9 (+/-57)	52,5 (+/-8)	3,5 (+/-2)	1,3 (+/-1)
1 Levure/1 macrophage	68,2 (+/-22)	132,4 (+/-40)	64 (+/-14)	17,3 (+/-3)	3 (+/-1)
10 Levures/1 macrophage	<b>288,9 (+/-98)</b>	<b>455 (+/-26)</b>	<b>274 (+/-33)</b>	7,3 (+/-2)	0,9 (+/-1)

Figure 24 : Expression glycanne de surface de *C. albicans* avant et après phagocytose par les J774.

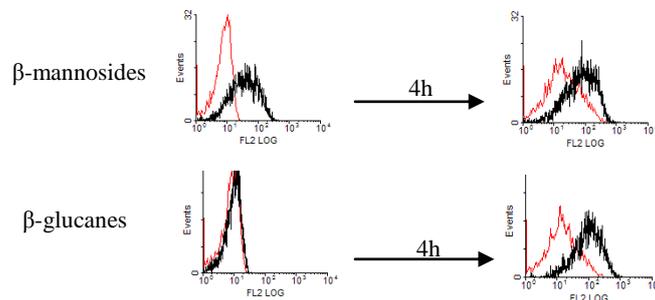
A- Pourcentage de cellules positives marquées pour les différents mannosides

B- Moyenne des Intensités de fluorescence des différents glycannes

Les résultats indiquent que lorsque le rapport levure/macrophage est de 1L/1M, les levures présentent des  $\alpha$ -1,2 mannosides avec une moyenne d'intensité de fluorescence moins importante qu'avant la mise en contact. Les levures marquées pour les  $\beta$ -mannosides ne présentent pas de variation significative d'expression glycanne. Cependant, le pourcentage de cellules positives marquées avec un anticorps anti- $\beta$ -mannosides, spécifique du sérotype A de *C. albicans* est diminuée. Le nombre de levures exposant des  $\beta$ -glucanes est augmenté. Ces résultats s'inscrivent dans la continuité des données précédemment obtenues.

Inversement, à un ratio 10L/1M, les levures sont toutes marquées pour les  $\alpha$ -1,2 mannosides, les  $\beta$ -mannosides avec des moyennes d'intensités de fluorescence fortement augmentées par rapport aux levures avant mise en contact avec les macrophages. Ni les  $\beta$ -glucanes, ni la chitine ne sont détectées.

**C. albicans 1L/1M :**



**Légende :**

— Contrôle négatif  
— Intensité de fluorescence des glycannes

**C. albicans 10L/1M :**

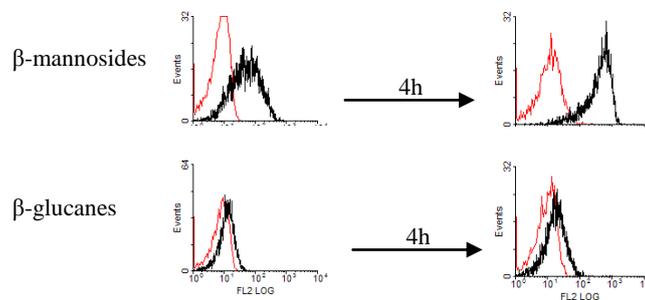


Figure 25 : Expression glycanne de surface des  $\beta$ -mannosides et des  $\beta$ -glucanes avant et après incubation les J774.

En ce qui concerne *S. cerevisiae*, les premiers résultats indiquent que l'expression des  $\alpha$ -1,2 mannosides n'est pas modulée en fonction du ratio levure/macrophage. De même, les  $\beta$ -mannosides et la chitine ne sont pas détectés. Cependant, il semble que les  $\beta$ -glucanes soient plus exposés à un ratio 10 levures/1 macrophage.

Ainsi, *S. cerevisiae* exposant des  $\beta$ -glucanes est efficacement éliminé par les macrophages. De même, à un ratio 1L/1M, *C. albicans* phagocyté est moins résistant à la lyse, endurant l'action des enzymes présentes dans le phagosome. Les glycannes de la paroi sont fortement attaqués notamment le mannane. Les  $\beta$ -glucanes sont exposés conduisant le macrophage à une réponse pro-inflammatoire. Cette réponse mène à la résistance de l'hôte.

Lorsque le ratio est à 10L/1M, *C. albicans* phagocytés résistent à la lyse, s'adaptent à l'environnement du phagosome et modulent ces glycannes. Les  $\beta$ -mannosides sont sur-exprimés et les  $\beta$ -glucanes non exposés. Cette configuration glycanne particulière est perçue par le macrophage. Une réponse de type anti-inflammatoire en résulte, menant à la dissémination de la levure.

## **DISCUSSION**

## DISCUSSION

*Candida albicans*, endo-saprophyte du tube digestif, est la levure du genre *Candida* la plus pathogène et la plus souvent isolée en milieu hospitalier. En effet, cette levure unicellulaire est à l'origine de candidoses superficielles et de candidoses profondes avec un taux de mortalité élevé (30 à 40% des cas). La physiopathologie de l'infection est complexe. Le passage de l'état de levure saprophyte à celui d'organisme pathogène est suscité par les conditions physiologiques de l'hôte (baisse des défenses immunitaires locales ou générales) et sous la dépendance de nombreux facteurs (grossesse, diabète, facteurs alimentaires...), permettant la multiplication des levures.

Plusieurs études ont montré que les macrophages étaient les cellules les plus actives vis-à-vis de *C. albicans* (Netea, *et al.*, 2004). Les interactions précoces entre *C. albicans* et les macrophages conduisent à la genèse de cascades de signalisation menant à tout un panel de phénomènes dans le but de l'élaboration une réponse immune adaptée. Ainsi, l'issue de l'infection repose sur un dialogue entre levure et cellule hôte. Les travaux récents ont montré que les glycannes pariétaux des levures étaient des stimuli conduisant à la production de cytokines par les cellules macrophagiques. En effet, l'utilisation de molécules purifiées, synthétiques et de nouvelles techniques, a permis de montrer que les constituants de la paroi de *C. albicans* jouaient un rôle déterminant dans les mécanismes de reconnaissance par l'hôte.

Ces polysaccharides et glycoconjugués sont reconnus par toute une gamme de récepteurs macrophagiques tels que les récepteurs lectiniques (galectine-3, dectine-1,...). De plus, il a été mis en évidence qu'à côté des systèmes lectiniques impliqués dans la reconnaissance des différents glycannes, les TLRs, notamment les TLR2 et TLR4 participaient à la modulation de la réponse inflammatoire observée lors des interactions des cellules avec les levures. Par ailleurs, les différents composants pariétaux peuvent être reconnus par un même TLR. De ce fait, la réponse cellulaire résulte d'une association particulière entre la lectine et le récepteur de signalisation et/ou d'une liaison directe ligand-lectine. La dectine-2, impliquée dans la reconnaissance d'une structure spécifique de huit mannoses, s'associe avec le Fc récepteur pour induire l'internalisation et activer la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (McGreal, *et al.*, 2006, Sato, *et al.*, 2006). Le TLR2 peut se lier à différents récepteurs lectiniques comme la galectine-3 qui reconnaît les  $\beta$ -1,2 oligomannosides (Fradin, *et al.*, 2000), ou la dectine-1 qui fixe les  $\beta$ -glucanes (Brown &

Gordon, 2001, Brown, *et al.*, 2003, Gantner, *et al.*, 2003). Un complexe formé du TLR4, du CD14 et du récepteur à mannose est à l'origine de la stimulation par le mannane (Tada, *et al.*, 2002). De plus, il a été récemment démontré que la dectine-1, en elle-même, était capable d'activer suite à la liaison de son ligand, les voies de signalisation (voie dépendante et indépendante de MyD88) (Gantner, *et al.*, 2005, Gross, *et al.*, 2006, Hara, *et al.*, 2007). La plupart des travaux effectués sur la stimulation induite par *C. albicans* portent principalement sur la production de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ , connues pour être protectrices de l'infection. Ainsi, les levures, les différents constituants glycaniques comme les  $\beta$ -glucanes et le PLM induisent une telle réponse (Jouault, *et al.*, 1994, Brown, *et al.*, 2003, Gantner, *et al.*, 2005).

Cependant, il est apparu qu'un même TLR puisse être à l'origine de mécanismes et de réponses inflammatoires opposées. Le TLR2 est impliqué dans la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10) (Netea *et al.*, 2004) et le PLM est capable également de moduler la transduction du signal via celui-ci et d'induire une apoptose mitochondriale (Ibata-Ombetta, *et al.*, 2001, Ibata-Ombetta, *et al.*, 2003, Ibata-Ombetta, *et al.*, 2003).

Le but de ce travail a été de déterminer le rôle spécifique de chaque famille de glycannes présentes dans la paroi des levures dans l'induction et la régulation de la réponse pro- et anti-inflammatoire. Pour cela, de nouveaux outils permettant d'analyser le rôle relatif des glycannes de paroi dans l'interaction avec les cellules macrophagiques ont été développés. De plus, l'évaluation de l'incidence de l'expression des glycannes pariétaux sur la réponse cellulaire de l'hôte et le rôle de la phagocytose dans l'induction de l'expression des glycannes pariétaux de levures ont été analysés.

L'utilisation des facteurs antigéniques produits pour l'identification des différentes espèces de *Candida* de même jointe à celle d'anticorps spécifiques des glycannes pariétaux nous a permis de caractériser et quantifier de façon précise le profil d'expression des glycannes de la paroi des levures en cytométrie de flux (Martinez-Esparza, *et al.*, 2006, Martinez-Esparza, *et al.*, 2009). Les résultats obtenus, en accord avec les données d'autres méthodes (Trinel, *et al.*, 2002), ont permis de valider la méthode de phénotypage des levures par cytométrie. Cette nouvelle méthodologie s'est avérée être une puissante technique de discrimination glycanique. En effet, les expériences réalisées indiquent que le mAb EB-CA1, (reconnaissance des chaînes glycanique comprenant au moins quatre  $\alpha$ -1,2 mannosides présents sur la fraction acide stable du mannane de *Candida*) et l'anticorps

5B2 (réactivité des chaînes d'au moins deux  $\beta$ -1,2 oligomannosides présents dans le mannane de *C. albicans*) permettent d'identifier spécifiquement *C. albicans* et de différencier cette levure pathogène de *S. cerevisiae*. De plus, les taux d'expression glycanique de surface détectés par le panel d'anticorps employés, démontrent que les épitopes reconnus sont différemment accessibles et modulables durant les étapes de la croissance d'une culture.

Cette technique a permis d'évaluer les performances en termes de sensibilité et de spécificité d'un nouvel anticorps 26G7. Celui-ci s'est révélé être un outil performant dans la caractérisation des souches de *C. albicans* de sérotype A. Le screening de mutants déficients en  $\beta$ -1,2 oligomannosides du laboratoire par cytométrie en flux a permis de spécifier les déterminants antigéniques reconnus par cet anticorps.

Des expériences de stimulation des cellules macrophagiques par les levures ont été réalisées. Les résultats indiquent que la charge fongique est un élément important dans le devenir l'infection par *C. albicans* en orientant la réponse immune.

En effet, que ce soit *C. albicans* ou *S. cerevisiae*, les levures induisent une production significative de cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$ . Cependant, la réponse macrophagique est modulée en fonction de la charge fongique. Il semble que lorsqu'un faible nombre de levure interagit avec les cellules macrophagiques, la réponse soit orientée préférentiellement vers une réponse de type pro-inflammatoire. Cette situation est inversée lorsqu'un grand nombre de levures stimule les macrophages, conduisant à une diminution de la sécrétion de cytokine pro-inflammatoire. Ces données sont en accord avec une étude indiquant que l'augmentation de la colonisation par *C. albicans* est nécessaire pour le développement d'une infection (Pittet, *et al.*, 1994). L'origine de cette modulation cytokinique a été recherchée. La mortalité des macrophages induite par les levures a été estimée. En effet, des travaux réalisés au laboratoire indiquent que le PLM est capable d'engager l'apoptose mitochondriale en jouant sur la signalisation induite lors de la phagocytose (Ibata-Ombetta, *et al.*, 2003). Cependant, les tests révèlent que la sécrétion de cytokine ne peut être reliée à la mortalité des macrophages. La viabilité des levures a aussi été estimée et il apparaît que des levures mortes stimulent peu les macrophages. Ainsi, l'effet suppresseur est tributaire de la charge fongique et de la viabilité des levures.

Plusieurs études ont montré que *C. albicans* était capable de sécréter certains composés en fonction de son environnement (Jouault, *et al.*, 1995, Chandra, *et al.*, 2007). De ce fait, des surnageants de culture de levures ou issus de co-culture levure/macrophage

à différents ratios levure-macrophage ont été évalués. Le surnageant de co-culture levure-macrophage à charge fongique importante abolit la production TNF- $\alpha$ . Les surnageants de levures cultivées seules stimulent de manière dose-dépendante la production de cytokine pro-inflammatoire. Cet effet est comparable à celui obtenu avec du PLM purifié (Jouault, *et al.*, 2003, Li, *et al.*, 2009).

Le farnesol est connu pour être associé à une forte charge fongique. Il est relargué par *C. albicans* et interfère avec la signalisation via le TLR2 (Decanis, *et al.*, 2009) et l'activité candidicide du stress oxydatif (Abe, *et al.*, 2009). De plus, Navarathna *et al* ont observé que l'addition de farnesol exogène dans un modèle murin de candidose systémique augmentait la virulence (Navarathna, *et al.*, 2007). Cependant, le farnesol ajouté à la culture de cellules macrophagiques, ne les stimule pas, aucune sécrétion de TNF- $\alpha$  n'est détectée. Ni le PLM, ni le farnesol n'engendrent la modulation cytokinique observée avec les levures vivantes.

La réponse anti-inflammatoire a été analysée en fonction de la charge fongique via la détection d'IL-10, cytokine réputée pour inhiber la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. *C. albicans* ou *S. cerevisiae* induisent une production significative de cytokines pro-inflammatoires telles que le TNF- $\alpha$ . Cependant, seul *C. albicans* stimule la sécrétion d'interleukine anti-inflammatoire. Un effet dose dépendant a été observé uniquement avec des blastoconidies vivantes. Ces résultats confirment les observations précédentes montrant que *C. albicans* était capable d'induire la sécrétion d'IL-10 et ainsi de réguler à son profit la réponse inflammatoire. Les surnageants de culture de levures ou de co-culture levure-macrophage ne stimulent pas la sécrétion d'IL-10. De même le PLM ou le farnesol. Le lien entre l'effet dose-dépendant d'IL-10 et la suppression de TNF- $\alpha$  est à établir.

Ces travaux indiquent que la réponse cytokinique induite par *C. albicans* peut prendre deux orientations immunes différentes en fonction de la charge fongique. Il a été montré que *C. albicans* vivant est détecté par la dectine-1, déclenchant l'activation de NFAT dans le macrophage, menant à la sécrétion d'IL-10 (Goodridge, *et al.*, 2007). Ce même récepteur est aussi impliqué dans la production de cytokines de type pro-inflammatoire (Brown, *et al.*, 2003, Taylor, *et al.*, 2007).

Un modèle cellulaire basé sur l'utilisation de levures vivantes présentant différents niveaux d'expression des glycannes pariétaux a été développé pour répondre à cette

problématique. L'analyse et la quantification des glycannes pariétaux ont été réalisées en cytométrie de flux.

Les expériences de stimulation des cellules macrophagiques par les différentes levures traitées ou non, ont montré qu'il existait une relation entre motifs glycaniques exposés par les levures et réponse des cellules.

Les résultats obtenus après traitements des levures ont montré que bien que les mannanes soient inducteurs de la production de TNF- $\alpha$ , les  $\beta$ -glucanes étaient les motifs les plus actifs dans cette activité. Le rôle des  $\beta$ -glucanes dans la stimulation pro-inflammatoire des cellules macrophagiques est bien établi (Gantner, *et al.*, 2005). Cependant, comme le montrent les résultats de cytométrie, les glucanes ne sont pas exposés à la surface des levures. Recouverts par le mannane, ils sont localisés profondément dans la paroi et ne deviennent accessibles qu'après chauffage ou traitement au  $\beta$ -mercaptoéthanol (Wheeler & Fink, 2006). Ils ne sont en fait démasqués que lors de la séparation entre la cellule mère et la cellule fille au niveau du site de bourgeonnement (Gantner, *et al.*, 2003). Ils sont de plus absents au niveau des hyphes (Heinsbroek, *et al.*, 2005).

En parallèle, les mannosides présents chez *C. albicans* et non chez *S. cerevisiae* sont à l'origine d'une forte production d'IL-10. Cette activité stimulatrice est perdue lorsque les cellules ont été traitées et que le mannane a été éliminé. Ces résultats semblent donc montrer qu'outre la stimulation de TNF- $\alpha$ , des mannosides spécifiques de *C. albicans* induisent la production d'IL-10. Cependant, la complexité moléculaire du mannane rend l'interprétation de ces résultats approximative. En effet, différents mécanismes concernant la contribution du mannane à la stimulation des cellules ont été avancés. Ils impliquent le TLR4 associé au CD14 (Tada, *et al.*, 2002) ou au MR (Netea, *et al.*, 2006) et également le TLR2 (Blasi, *et al.*, 2005, Gil, *et al.*, 2005). Le ligand spécifiquement reconnu est controversé. Ainsi, Netea *et al* montrent via des mutants de *C. albicans* invalidés pour certaines mannosyltransférases, que ce sont les  $\alpha$ -mannosides qui sont responsables de la stimulation des cellules et non le phosphomannane qui n'a peu d'incidence sur la réponse inflammatoire (Netea, *et al.*, 2006).

Or, les observations effectuées en parallèle via la technique de cytométrie en flux montrent l'expression préférentielle des  $\beta$ -1,2 mannosides à la surface des levures présentant cette activité, suggérant donc un rôle particulier pour les  $\beta$ -1,2 mannosides dans la réponse anti-inflammatoire des cellules. Le contexte spécifique du phagosome stimule la levure. Tout une gamme de phénomènes (changement de pH, enzymes, etc...) a lieu à

l'intérieur dans le but de détruire le pathogène. *C. albicans* répond à son nouvel environnement en modulant ces glycannes pariétaux. Les profils d'expression glycannique de surface de *C. albicans* ont été évalués suite à la phagocytose.

Les données indiquent que l'expression glycannique de surface est dépendante du ratio levure-macrophage. En effet, à charge fongique élevée, l'expression des  $\beta$ -mannosides est augmentée et les  $\beta$ -glucanes non exposés. Inversement, lorsque qu'il s'agit d'un faible nombre de levures, les  $\beta$ -mannosides sont moins accessibles et les  $\beta$ -glucanes révélés. En parallèle, la viabilité des levures endocytées a été analysée.

Les levures phagocytées exprimant des  $\beta$ -glucanes sont moins résistantes à la lyse, endurant l'action des enzymes présentes dans le phagosome. Les glycannes de la paroi sont fortement attaqués notamment le mannane. Les  $\beta$ -glucanes sont exposés conduisant le macrophage à une réponse pro-inflammatoire. Les levures présentant un taux élevé de  $\beta$ -mannosides résistent à la lyse, s'adaptent à l'environnement du phagosome et modulent ces glycannes. Les  $\beta$ -mannosides sont sur-exprimés et les  $\beta$ -glucanes non exposés. Cette modification d'expression glycannique de surface est perçue par le macrophage. Une réponse de type anti-inflammatoire en résulte, suggérant que ce mécanisme participe à la dissémination de la levure.

Les PRRs sont impliqués dans la reconnaissance et dans la phagocytose du pathogène. De même, les lectines et TLRs, engagées dans ce processus, facilitent celle-ci (Cambi, *et al.*, 2003, Porcaro, *et al.*, 2003). Leurs rôles exacts sont mal connus. Des études indiquent que certaines lectines sont plus ou moins recrutées au niveau du phagosome ainsi que certains TLRs. La galectine-3 est associée à *C. albicans* dans le phagosome et transmet des signaux spécifiques sans toutefois interférer avec l'efficacité de phagocytose de la levure (Jouault, *et al.*, 2006). Il a été démontré que les TLRs sont impliqués dans l'activation de voies de signalisation régulant la maturation du phagosome (Blander & Medzhitov, 2004, Underhill, 2007). De même, en fonction du ligand présenté, les réponses mises en place ne sont pas identiques.

Les  $\beta$ -1,2 mannosides, bien qu'à l'origine d'une réponse pro-inflammatoire, initient donc une sécrétion de cytokines anti-inflammatoires. Ces résultats sont en accord avec la description du rôle du TLR2 dans les deux types de réponse cellulaire. En effet, des expériences fondées sur l'utilisation de souris invalidées pour le gène de TLR2 avaient montré que le TLR2 était à l'origine de la sécrétion d'IL-10 induite par *C. albicans* (Netea, *et al.*, 2004). Les résultats que nous avons obtenus suggèrent qu'il puisse exister un mécanisme de compétition vis-à-vis du TLR2 entre les glycannes associés à la lectine les

reconnaissant spécifiquement (dectine-1 pour les  $\beta$ -glucanes et galectine-3 pour les  $\beta$ -mannosides). La résultante aboutissant à une réponse pro- ou anti-inflammatoire. Contrairement à la dectine-1 qui est exprimée à la membrane des cellules, la galectine-3 a également été localisée au niveau des phagosomes contenant *C. albicans* (Jouault, *et al.*, 2006). Il semble donc qu'une association particulière puisse exister entre la galectine-3 et le TLR2, également localisé à ce niveau.

Les résultats obtenus dans ce travail ont confirmé le rôle des différents glycannes pariétaux dans la modulation de la réponse immune au cours des interactions entre *C. albicans* et les cellules macrophagiques. En fonction des glycannes exposés à la surface de la levure, des récepteurs de l'hôte impliqués, deux orientations de la réponse immune peuvent en résulter. Les conséquences sont plus qu'importantes puisqu'en fonction de ces étapes initiales de la reconnaissance, la prise en charge de la levure par l'hôte conduira soit à la résistance soit à la sensibilité vis-à-vis de *C. albicans*.

## **MATERIELS ET METHODES**

## MATERIELS ET METHODES

### I. Souches de levures et cellules macrophagiques

#### 1- Levures

##### a. Souches de levures

Différentes souches de *C. albicans* sérotype A : SC5314 (Gillum, *et al.*, 1984), BWP17 (Fonzi & Irwin, 1993, Wilson, *et al.*, 1999), VW32 (Cantelli, *et al.*, 1995), NIH A-207 (Shibata, *et al.*, 1985), NCPF 3153 (Gillum, *et al.*, 1984), ainsi que des souches de *C. albicans* sérotype B : LGH 1095, ATCC26298 (American Type Culture collection, (Rockville, MD, U.S.A), NIH B-792 (Shibata, *et al.*, 1985), NCPF 3156 (Gillum, *et al.*, 1984), une souche *Candida dubliniensis*, deux souches *Candida glabrata* (BG2 et *C. glabrata* 9453.101 wild-type clinical isolate) et une souche haploïde référencée de *Saccharomyces cerevisiae* (Euroscarf) : S288C, ont été utilisées dans les expériences. De plus, la détermination antigénique du mAb 26G7 a nécessité l'utilisation de 3 souches (Bmt1, 2 et 3) mutées dans des gènes de la  $\beta$ -1,2 mannosylation (Mille, *et al.*, 2004).

##### b. Obtention des modèles cellulaires

###### ➤ Traitement des levures à la chaleur

$2.10^7$  levures/ml d'H<sub>2</sub>O miliQ ont été tuées par chauffage au bain marie à 100°C pendant 20 min. Les levures ont été ensuite lavées par du PBS, comptées et transférées dans du DMEM à une concentration déterminée.

###### ➤ Modèle de levures vivantes présentant différents niveaux de glycannes fongiques

Après culture, les levures ( $40.10^6$  cellules/ml) sont lavées avec de l'eau, centrifugées à 3000 g pendant 4 min puis dans une solution de sorbitol 1M. Le culot est ensuite suspendu dans un mélange sorbitol 1M,  $\beta$ -mercaptoéthanol 40mM à pH 9 à 28°C pendant 30 min.

Après centrifugation (1000 à 1200 g pendant 10 min), le culot est lavé plusieurs fois dans une solution de sorbitol 1M, suspendu dans cette même solution et conservé à 4°C.

### c. Milieux et condition de culture

Les levures sont cultivées soit sur du milieu YPD agar solide (Yeast extract 1%, Peptone 1%, Dextrose 2%, agar 2%) ou sur milieu SDA agar solide (Sabouraud dextrose 3%, agar 1,5 %) à 37°C et conservées à 4°C.

Avant utilisation, une pré-culture est réalisée à l'aide dans le milieu YPD liquide à 37°C pendant 18 à 20 h. Pour l'obtention du modèle cellulaire, un volume de cette pré-culture (défini en fonction des quantités de levures souhaitées) est repris dans un milieu YPD liquide pendant 3h afin que les levures soient en phase exponentielle.

Pour les levures maintenues à 4°C sur SDA, les levures sont repiquées sur un milieu SDA agar solide frais et incubées à 24°C pendant 48h.

## 2- Les lignées cellulaires :

### a. Lignées cellulaires

Les cellules J774 sont des cellules tumorales (ECACC 85011428) de souris femelle Balb/c dépourvues de récepteurs pour le mannose (MR). La lignée cellulaire murine macrophagique RAW 264.7 est issue de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA).

### b. Milieux et condition de culture

Les cellules macrophagiques sont cultivées sous forme adhérente en flacon de 125 cm<sup>2</sup> dans du milieu de culture DMEM (Gibco®) supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal, 2 mM de glutamine et 100 µg/ml de streptomycine. Tous les deux jours, le milieu de culture est renouvelé et les cellules divisées à 10% par décollement avec un « scrapper ».

## II. Analyse de l'expression glycanique de surface

### 1- Anticorps utilisés

Une partie des réactifs a été obtenue chez Sigma (Sigma Aldrich Chimie Saint Quentin Fallavier, France). L'anticorps monoclonal anti  $\beta$ -1,2 mannosides, 5B2, une IgM de rat, a été développé dans nos laboratoires (Poulain, *et al.*, 1991). L'anticorps polyclonal de lapin dirigé contre les facteurs antigéniques 1, 5 et 6 a été acheté à Iatron (Tokyo, Japon). L'anticorps anti  $\beta$ -1,3 glucanes de même spécificité que la dectine-1 (Wheeler & Fink, 2006), une IgG monoclonale de souris, a été fourni par Biosupplies (Pty, Australie). L'anticorps B9E et 26G7, IgM de souris, nous a été donné par J. Ponton (Espagne). L'anticorps monoclonal anti- $\beta$ -1,2 mannoside EB-CA1, une IgM de rat, a été fourni par Bio-Rad SA, Marnes la Coquette, France.

Les conjugués, anti-rat IgM, anti-souris IgG ou anti-lapin IgG marqués à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) ou à la phycoérythrine (PE) proviennent des laboratoires méridionaux de biotechnologie (Birmingham, AL).

### 2- Cytométrie de flux

Les levures ( $10^6$  cellules/ml) ont été lavées avec du tampon PBS-2% sérum de veau décomplémenté puis avec du tampon PBS-2% sérum de veau décomplémenté-1% BSA à 4°C. Après centrifugation, les cellules ont été incubées avec l'anticorps monoclonal ou polyclonal correspondant dilué à différentes concentrations dans du tampon PBS-2% sérum de veau décomplémenté-1% BSA pendant 15min à 4°C. Les conjugués utilisés sont couplés à des fluorochromes (FITC ou PE) ou fluorescents. Après plusieurs lavages, les anticorps secondaires dilués à différentes concentrations dans du tampon PBS-2% sérum de veau décomplémenté-1% BSA ont été ajoutés pendant 15 min à 4°C. Les levures sont ensuite lavées 2 fois avec du PBS-2% sérum de veau décomplémenté-1% BSA puis du PBS seul et fixées à l'aide de paraformaldehyde 4%.

L'analyse en cytométrie de flux a été réalisée sur EPICS XLMCL4 (Beckman Coulter, High Wycombe, UK) équipé d'un laser d'argon avec une puissance d'excitation de 15mW à 488 nm. La granulométrie des cellules (FSC) ainsi que la taille de celles-ci (SSC) ont été analysées sur des échelles linéaires, tandis que l'intensité de fluorescence verte (FL1) et rouge (FL2) sur des échelles logarithmiques. Des régions d'analyse ont été constituées autour des différentes populations à partir d'un dotplot comportant en abscisse la taille et en ordonnée la granulométrie. Les histogrammes de fluorescence de 5.000 cellules ont été

produits en utilisant les données de plusieurs expériences. L'acquisition et l'analyse de données ont été effectuées à l'aide du logiciel de WINMDI (fourni par <http://facs.scripps.edu>). L'intensité de fluorescence moyenne a été obtenue par soustraction de la valeur contrôle négative pour chaque antigène.

### 3- Immunofluorescence indirecte

L'immunofluorescence indirecte a été réalisée selon le protocole utilisé pour la cytométrie de flux avec des temps d'incubation d'1h au lieu de 15 min par anticorps. Les levures ne sont cependant pas fixés par du paraformaldehyde 4% mais ont été lavés 2 fois avec du PBS-2% sérum de veau décomplémenté-1% BSA puis du PBS seul. Les lames sont observées au microscope à fluorescence après montage au moviol.

### III. Evaluations des performances de l'anticorps 26G7

#### 1- Technique immunoélectrophorétique

##### a. Extraction alcaline en condition réductrice (AERC)

Les levures cultivées 48h à 24°C sur milieu Sabouraud solide sont lavées plusieurs fois avec du tampon phosphate 50mM (centrifugation 3000rpm, 8min). Le culot cellulaire est repris par une solution de soude 1,85M, 2-β-mercaptoéthanol 5% (vol/vol) (0,5 ml pour 10<sup>9</sup> levures). Après agitation, la solution est laissée 15min dans la glace puis un même volume d'acide trichloracétique (TCA) à 50% est ajouté pour précipiter les protéines extraites. Ce mélange est laissé 15 min dans la glace puis après centrifugation à 4000rpm, 10min). Le culot ensuite repris par de la solution dénaturante d'électrophorèse (0,1 ml pour 10<sup>9</sup> levures au départ) et chauffé 5 min à 100°C. Le surnageant obtenu après centrifugation 10 min à 10000rpm est conservé à -20°C.

##### b. Dosage des protéines

Les protéines sont dosées selon la méthode de l'acide bicinchoninique (BCA, Pierce) en utilisant la BSA comme gamme étalon. 50 µl de solution à doser sont incubées avec 1 ml de réactif BCA 30 min à 37°C pour le dosage standard (seuil de détection : 0,2 à 1,2 mg/ml) ou 30 min à 60°C pour le micro-dosage (seuil de détection : 0,05 à 0,25 mg/ml). La densité optique est lue à 562nm.

##### c. Traitement des échantillons

Les échantillons sont repris dans la solution dénaturante d'électrophorèse contenant du Tris-HCL 62,5mM pH6,8, SDS 2%, glycérol 10% et du bleu de bromophénol 2%, en conditions réductrices, 5% de 2-β-mercaptoéthanol sont ajoutés. Les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 5min avant d'être déposé sur le gel.

##### d. Electrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)

Les extraits sont analysés après électrophorèse (SDS-PAGE). Le gel comprend deux parties : le gel de séparation, gradient (5-20 % d'acrylamide), et le gel de concentration à 5 % d'acrylamide. L'électrophorèse est réalisée en intensité constante à 30 mA pendant 3,5h en tampon Tris 25 mM, glycine 192 mM et SDS 0.1 %.

e. Electrophorétique en milieu semi sec

Après électrophorèse, le gel de polyacrylamide est déposé sur une membrane de nitrocellulose préalablement trempée dans le tampon de transfert (Tris 48 mM, glycine 39 mM, SDS 0.037%, méthanol 20 %). Le gel et la membrane sont ensuite placés entre des feuilles de papier Whatman dans l'appareil de transfert semi-sec. Le transfert s'effectue pendant 45 min à 200 mA.

f. Immunodétection sur membrane de nitrocellulose (Western blot)

Après coloration au rouge ponceau (pour vérifier l'efficacité du transfert), la membrane de nitrocellulose a été saturée avec du tampon TNT (Tris 10 mM, NaCl 120 mM, 0,01% Tween 20) contenant 5% BSA pendant 2h à 20°C. Elle a été ensuite lavée plusieurs fois avec du tampon TNT-1% BSA et incubée pendant 2h à 20°C avec l'anticorps primaire correspondant. Les anticorps sont dilués au 1/4000<sup>e</sup> pour le 5B2, 1/1000 pour l'EB-CA1, le B6.1, 26G7 et pour le B9E dans du TNT-1% BSA. Après plusieurs lavages en TNT-1% BSA, la membrane a été ensuite incubée avec un anticorps anti-IgM de rat (1/4000) ou un anti-IgM de souris (1/1000) couplé à la peroxydase pendant 1h à température ambiante sous agitation. La peroxydase est ensuite révélée en chimioluminescence par incubation de la membrane 2 à 5 min dans du luminol (Super Signal<sup>TM</sup> substrate, Pierce). Des films photographiques kodak sont ensuite exposés 30 sec à 10 min aux membranes, révélés et fixés.

2- Luminex

Des microbilles magnétiques (Biorad) ont été lavées dans une solution d'éthanol pur. Les fonctions carboxyles des billes ont été activées par une solution sulfo-NHS et d'EDC (1-Ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide HCl). Elles sont ensuite lavées dans du tampon PBS 50mM-NaCl 150 mM.

Le couplage bille-avidine a été effectué pendant 3h en présence d'1,2 mg d'avidine (Pierce). Les billes ont été saturées à l'aide d'une solution NH<sub>2</sub>OH 250mM-PBS 50mM-NaCl 150 mM puis lavées à l'aide du tampon PBS-NaCl-Tween 1%.

Environ 100 µg de mannane (VW32, SC5314, Caf pH2, NIHB ou SU1) ou d'oligomannosides de synthèse biotinylés (Dia, tétraα, diβ, triβ et tétraβ mannosides) (ENS, Paris) ont été ajoutés à 600 µg de billes, pendant 3h à 37°C sous agitation. Les billes ont été ensuite lavées 3 fois par du tampon PBS/Tween20 1%, saturées pendant une nuit à

4°C en présence de tampon PBS/BSA 10%, puis rincées avec du tampon PBS dans lequel elles seront stockées à 4°C.

Afin d'évaluer l'efficacité des couplages, les billes ont été incubées avec l'anticorps de référence B9E (1/80<sup>ème</sup>) et le 26G7 (1/80<sup>ème</sup>), 30 min à 37°C sous agitation. Cette incubation est suivie de 3 lavages dans du tampon PBS. Une dernière incubation, sous agitation à 37°C pendant 30 min, est réalisée en présence d'anticorps IgG anti-souris conjugué à la phycoérythrine (PE) à une concentration de 1µg/ml.

Après 3 lavages, les billes sont reprises dans 35µL de tampon PBS avant lecture au Luminex (Biorad). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 532 nm et de 575±12 nm. Le témoin négatif, la gamme étalon et les échantillons sont ensuite lus et les résultats sont rendus sous forme de signal fluorescent. La lecture d'un blanc (billes dans du tampon PBS), permet de déterminer l'intensité du bruit de fond et de délimiter la zone de lecture.

#### **IV. Analyse de l'interaction *C. albicans*-macrophages**

##### 1- Etude de la viabilité des levures après phagocytose par les macrophages

Suite à 4 heures d'incubation, les macrophages sont lavés plusieurs fois avec DMEM puis du PBS stérile. L'eau distillée stérile est ajoutée dans chaque puits. Ce traitement, entraînant une lyse des macrophages, n'altère pas la viabilité des levures. Les levures endocytées sont récupérées et sont comptées en cellule de Thomas. Un volume correspondant à 100 levures sont ensemencées sur milieu SDA solide et incubées une nuit à 37°C. Le lendemain, le nombre d'unités formant colonie (CFU) est déterminé.

##### 2- Dosage immunoenzymatique du TNF- $\alpha$ et de l'IL-10

La présence des cytokines dans les surnageants de culture a été examinée par dosage immunoenzymatique (DuoSet®, R&D systems). Des plaques d'ELISA sont d'abord sensibilisées avec un anticorps de chèvre anti-TNF $\alpha$  de souris ou anti-IL-10 de souris une nuit à température ambiante. Après lavage en PBS-Tween 0.05%, la plaque est saturée avec une solution de BSA 1% pendant 1h à température ambiante. Après lavage de la plaque, 100  $\mu$ l de surnageant de cultures sont déposés et incubés pendant 2h à température ambiante. L'anticorps secondaire, un anticorps anti-TNF- $\alpha$  ou anti-IL-10 produit chez la chèvre biotinylé, est déposé dans chaque puits. Après 3 lavages, la streptavidine conjuguée à la peroxydase est ajoutée pendant 20 min à température ambiante. La révélation s'effectue à l'obscurité en ajoutant 100  $\mu$ l du substrat chromogène (TMB) de la peroxydase pendant 20 min à température ambiante. Après arrêt de la réaction avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N, la densité optique est lue par un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 450nm.

## **BIBLIOGRAPHIE**

## BIBLIOGRAPHIE

- [1] Abe S, Tsunashima R, Iijima R, *et al.* (2009) Suppression of anti-Candida activity of macrophages by a quorum-sensing molecule, farnesol, through induction of oxidative stress. *Microbiol Immunol* **53**: 323-330.
- [2] Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, *et al.* (2007) Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* **8**: 639-646.
- [3] Akashi-Takamura S & Miyake K (2008) TLR accessory molecules. *Curr Opin Immunol* **20**: 420-425.
- [4] Alem MA & Douglas LJ (2004) Effects of aspirin and other nonsteroidal anti-inflammatory drugs on biofilms and planktonic cells of *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 41-47.
- [5] Alem MA & Douglas LJ (2005) Prostaglandin production during growth of *Candida albicans* biofilms. *J Med Microbiol* **54**: 1001-1005.
- [6] Algarra I, Ortega E, Serrano MJ, Alvarez de Cienfuegos G & Gaforio JJ (2002) Suppression of splenic macrophage *Candida albicans* phagocytosis following in vivo depletion of natural killer cells in immunocompetent BALB/c mice and T-cell-deficient nude mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **33**: 159-163.
- [7] Almkvist J & Karlsson A (2004) Galectins as inflammatory mediators. *Glycoconj J* **19**: 575-581.
- [8] Annaix V, Bouchara JP, Tronchin G, Senet JM & Robert R (1990) Structures involved in the binding of human fibrinogen to *Candida albicans* germ tubes. *FEMS Microbiol Immunol* **2**: 147-153.
- [9] Arancia G, Stringaro A, Crateri P, *et al.* (1998) Interaction between human interleukin-2-activated natural killer cells and heat-killed germ tube forms of *Candida albicans*. *Cell Immunol* **186**: 28-38.
- [10] Aratani Y, Koyama H, Nyui S, Suzuki K, Kura F & Maeda N (1999) Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase. *Infect Immun* **67**: 1828-1836.
- [11] Aratani Y, Kura F, Watanabe H, *et al.* (2002) Critical role of myeloperoxidase and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase in high-burden systemic infection of mice with *Candida albicans*. *J Infect Dis* **185**: 1833-1837.
- [12] Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, *et al.* (2000) Cloning of a second dendritic cell-associated C-type lectin (dectin-2) and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem* **275**: 11957-11963.
- [13] Ashman RB & Papadimitriou JM (1995) Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. *Microbiol Rev* **59**: 646-672.
- [14] Ashman RB, Fulurija A & Papadimitriou JM (1999) Both CD4+ and CD8+ lymphocytes reduce the severity of tissue lesions in murine systemic candidiasis, and CD4+ cells also demonstrate strain-specific immunopathological effects. *Microbiology* **145** ( Pt 7): 1631-1640.
- [15] Bacci A, Montagnoli C, Perruccio K, *et al.* (2002) Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. *J Immunol* **168**: 2904-2913.
- [16] Balish E, Warner T, Pierson CJ, Bock DM & Wagner RD (2001) Oropharyngeal candidiasis is lethal for transgenic mice with combined natural killer and T-cell defects. *Med Mycol* **39**: 261-268.

- [17] Banno Y, Yamada T & Nozawa Y (1985) Secreted phospholipases of the dimorphic fungus, *Candida albicans*; separation of three enzymes and some biological properties. *Sabouraudia* **23**: 47-54.
- [18] Barnett JA (2000) A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries, 1850-1880. *Yeast* **16**: 755-771.
- [19] Barrett-Bee K, Hayes Y, Wilson RG & Ryley JF (1985) A comparison of phospholipase activity, cellular adherence and pathogenicity of yeasts. *J Gen Microbiol* **131**: 1217-1221.
- [20] Bastidas RJ & Heitman J (2009) Trimorphic stepping stones pave the way to fungal virulence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 351-352.
- [21] Bates S, Hughes HB, Munro CA, *et al.* (2006) Outer chain N-glycans are required for cell wall integrity and virulence of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **281**: 90-98.
- [22] Beausejour A, Grenier D, Goulet JP & Deslauriers N (1998) Proteolytic activation of the interleukin-1beta precursor by *Candida albicans*. *Infect Immun* **66**: 676-681.
- [23] Becker I, Salaiza N, Aguirre M, *et al.* (2003) *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* **130**: 65-74.
- [24] Bell JK, Mullen GE, Leifer CA, Mazzoni A, Davies DR & Segal DM (2003) Leucine-rich repeats and pathogen recognition in Toll-like receptors. *Trends Immunol* **24**: 528-533.
- [25] Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, *et al.* (2004) The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens in vivo. *J Immunol* **172**: 3059-3069.
- [26] Berg DJ, Davidson N, Kuhn R, *et al.* (1996) Enterocolitis and colon cancer in interleukin-10-deficient mice are associated with aberrant cytokine production and CD4(+) TH1-like responses. *J Clin Invest* **98**: 1010-1020.
- [27] Bishop CT, Blank, F., & Gardner, P. E. (1960) The cell wall polysaccharides of *Candida albicans* : glucan, mannan and chitin. *Can J Chem* **38**: 869-881.
- [28] Black CA, Eyers FM, Russell A, Dunkley ML, Clancy RL & Beagley KW (1999) Increased severity of *Candida* vaginitis in BALB/c nu/nu mice versus the parent strain is not abrogated by adoptive transfer of T cell enriched lymphocytes. *J Reprod Immunol* **45**: 1-18.
- [29] Blander JM & Medzhitov R (2004) Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science* **304**: 1014-1018.
- [30] Blankenship JR & Mitchell AP (2006) How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol* **9**: 588-594.
- [31] Blasi E, Mucci A, Neglia R, *et al.* (2005) Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **44**: 69-79.
- [32] Blumberg HM, Jarvis WR, Soucie JM, *et al.* (2001) Risk factors for candidal bloodstream infections in surgical intensive care unit patients: the NEMIS prospective multicenter study. The National Epidemiology of Mycosis Survey. *Clin Infect Dis* **33**: 177-186.
- [33] Bottino C, Castriconi R, Moretta L & Moretta A (2005) Cellular ligands of activating NK receptors. *Trends Immunol* **26**: 221-226.
- [34] Bougnoux ME, Kac G, Aegerter P, d'Enfert C & Fagon JY (2008) Candidemia and candiduria in critically ill patients admitted to intensive care units in France: incidence, molecular diversity, management and outcome. *Intensive Care Med* **34**: 292-299.
- [35] Boxx GM, Kozel TR, Nishiya CT & Zhang MX Influence of mannan and glucan on complement activation and C3 binding by *Candida albicans*. *Infect Immun* **78**: 1250-1259.
- [36] Bozza S, Montagnoli C, Gaziano R, Rossi G, Nkwanyuo G, Bellocchio S & Romani L (2004) Dendritic cell-based vaccination against opportunistic fungi. *Vaccine* **22**: 857-864.

- [37] Brassart D, Woltz A, Golliard M & Neeser JR (1991) In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc alpha 1----2Gal beta-bearing complex carbohydrates. *Infect Immun* **59**: 1605-1613.
- [38] Braun PC & Calderone RA (1978) Chitin synthesis in *Candida albicans*: comparison of yeast and hyphal forms. *J Bacteriol* **133**: 1472-1477.
- [39] Bromuro C, Torosantucci A, Gomez MJ, Urbani F & Cassone A (1994) Differential release of an immunodominant 65 kDa mannoprotein antigen from yeast and mycelial forms of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol* **32**: 447-459.
- [40] Bromuro C, Torosantucci A, Chiani P, Conti S, Polonelli L & Cassone A (2002) Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated Candidiasis in recipients of a *Candida albicans* vaccine. *Infect Immun* **70**: 5462-5470.
- [41] Brouwer N, Dolman KM, van Houdt M, Sta M, Roos D & Kuijpers TW (2008) Mannose-binding lectin (MBL) facilitates opsonophagocytosis of yeasts but not of bacteria despite MBL binding. *J Immunol* **180**: 4124-4132.
- [42] Brown GD (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* **6**: 33-43.
- [43] Brown GD & Gordon S (2001) Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* **413**: 36-37.
- [44] Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall AS & Gordon S (2003) Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* **197**: 1119-1124.
- [45] Buckley HR, Richardson MD, Evans EG & Wheat LJ (1992) Immunodiagnosis of invasive fungal infection. *J Med Vet Mycol* **30 Suppl 1**: 249-260.
- [46] Bugarcic A, Hitchens K, Beckhouse AG, Wells CA, Ashman RB & Blanchard H (2008) Human and mouse macrophage-inducible C-type lectin (Mincle) bind *Candida albicans*. *Glycobiology* **18**: 679-685.
- [47] Calderone R (2002) *Candida* and candidiasis. *Washington*.
- [48] Calderone RA (1993) Molecular interactions at the interface of *Candida albicans* and host cells. *Arch Med Res* **24**: 275-279.
- [49] Calderone RA (1993) Recognition between *Candida albicans* and host cells. *Trends Microbiol* **1**: 55-58.
- [50] Calderone RA & Fonzi WA (2001) Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**: 327-335.
- [51] Calderone RA, Linehan L, Wadsworth E & Sandberg AL (1988) Identification of C3d receptors on *Candida albicans*. *Infect Immun* **56**: 252-258.
- [52] Camargo MR, Venturini J, Vilani-Moreno FR & Arruda MS (2009) Modulation of macrophage cytokine profiles during solid tumor progression: susceptibility to *Candida albicans* infection. *BMC Infect Dis* **9**: 98.
- [53] Cambi A, Gijzen K, de Vries JM, *et al.* (2003) The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* **33**: 532-538.
- [54] Cambi A, Netea MG, Mora-Montes HM, *et al.* (2008) Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *J Biol Chem* **283**: 20590-20599.
- [55] Cantelli C, Trinel PA, Bernigaud A, Jouault T, Polonelli L & Poulain D (1995) Mapping of beta-1,2-linked oligomannosidic epitopes among glycoconjugates of *Candida* species. *Microbiology* **141 ( Pt 10)**: 2693-2697.
- [56] Cantorna MT & Balish E (1990) Mucosal and systemic candidiasis in congenitally immunodeficient mice. *Infect Immun* **58**: 1093-1100.

- [57] Casadevall A, Cassone A, Bistoni F, *et al.* (1998) Antibody and/or cell-mediated immunity, protective mechanisms in fungal disease: an ongoing dilemma or an unnecessary dispute? *Med Mycol* **36 Suppl 1**: 95-105.
- [58] Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D & Martinez JP (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 130-180.
- [59] Chalifour A, Jeannin P, Gauchat JF, *et al.* (2004) Direct bacterial protein PAMP recognition by human NK cells involves TLRs and triggers alpha-defensin production. *Blood* **104**: 1778-1783.
- [60] Chandra J, McCormick TS, Imamura Y, Mukherjee PK & Ghannoum MA (2007) Interaction of *Candida albicans* with adherent human peripheral blood mononuclear cells increases *C. albicans* biofilm formation and results in differential expression of pro- and anti-inflammatory cytokines. *Infect Immun* **75**: 2612-2620.
- [61] Chen H & Fink GR (2006) Feedback control of morphogenesis in fungi by aromatic alcohols. *Genes Dev* **20**: 1150-1161.
- [62] Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J & Fink GR (2004) Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 5048-5052.
- [63] Chiani P, Bromuro C & Torosantucci A (2000) Defective induction of interleukin-12 in human monocytes by germ-tube forms of *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**: 5628-5634.
- [64] Chignard M, Le Couedic JP, Tence M, Vargaftig BB & Benveniste J (1979) The role of platelet-activating factor in platelet aggregation. *Nature* **279**: 799-800.
- [65] Choi JH, Ko HM, Kim JW, Lee HK, Han SS, Chun SB & Im SY (2001) Platelet-activating factor-induced early activation of NF-kappa B plays a crucial role for organ clearance of *Candida albicans*. *J Immunol* **166**: 5139-5144.
- [66] Clark TA & Hajjeh RA (2002) Recent trends in the epidemiology of invasive mycoses. *Curr Opin Infect Dis* **15**: 569-574.
- [67] Colmenares M, Puig-Kroger A, Pello OM, Corbi AL & Rivas L (2002) Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania* amastigotes. *J Biol Chem* **277**: 36766-36769.
- [68] Conde-Rosa A, Amador R, Perez-Torres D, *et al.* (2010) Candidemia distribution, associated risk factors, and attributed mortality at a university-based medical center. *P R Health Sci J* **29**: 26-29.
- [69] Cox D & Greenberg S (2001) Phagocytic signaling strategies: Fc(gamma)receptor-mediated phagocytosis as a model system. *Semin Immunol* **13**: 339-345.
- [70] Cremer J, Vatou V & Braveny I (1999) 2,4-(hydroxyphenyl)-ethanol, an antioxidative agent produced by *Candida* spp., impairs neutrophilic yeast killing in vitro. *FEMS Microbiol Lett* **170**: 319-325.
- [71] Critchley IA & Douglas LJ (1987) Isolation and partial characterization of an adhesin from *Candida albicans*. *J Gen Microbiol* **133**: 629-636.
- [72] d'Ostiani CF, Del Sero G, Bacci A, *et al.* (2000) Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* **191**: 1661-1674.
- [73] De Bernardis F, Boccanera M, Adriani D, Spreghini E, Santoni G & Cassone A (1997) Protective role of antimannan and anti-aspartyl proteinase antibodies in an experimental model of *Candida albicans* vaginitis in rats. *Infect Immun* **65**: 3399-3405.
- [74] De Bernardis F, Liu H, O'Mahony R, *et al.* (2007) Human domain antibodies against virulence traits of *Candida albicans* inhibit fungus adherence to vaginal epithelium and protect against experimental vaginal candidiasis. *J Infect Dis* **195**: 149-157.

- [75] de Viragh PA, Sanglard D, Togni G, Falchetto R & Monod M (1993) Cloning and sequencing of two *Candida parapsilosis* genes encoding acid proteases. *J Gen Microbiol* **139**: 335-342.
- [76] Decanis N, Savignac K & Rouabhia M (2009) Farnesol promotes epithelial cell defense against *Candida albicans* through Toll-like receptor 2 expression, interleukin-6 and human beta-defensin 2 production. *Cytokine* **45**: 132-140.
- [77] Deepe GS, Jr. (1997) Prospects for the development of fungal vaccines. *Clin Microbiol Rev* **10**: 585-596.
- [78] Del Palacio A, Villar J & Alhambra A (2009) [Epidemiology of invasive candidiasis in pediatric and adult populations]. *Rev Iberoam Micol* **26**: 2-7.
- [79] Della Chiesa M, Sivori S, Castriconi R, Marcenaro E & Moretta A (2005) Pathogen-induced private conversations between natural killer and dendritic cells. *Trends Microbiol* **13**: 128-136.
- [80] Delves P. SM, D. Burton, I. Roitt (2006) Roitt's Essential Immunology. *Wiley-Blackwell* **11 th ed.**
- [81] Dennehy KM & Brown GD (2007) The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol* **82**: 253-258.
- [82] Deva R, Ciccoli R, Kock L & Nigam S (2001) Involvement of aspirin-sensitive oxylipins in vulvovaginal candidiasis. *FEMS Microbiol Lett* **198**: 37-43.
- [83] Deva R, Shankaranarayanan P, Ciccoli R & Nigam S (2003) *Candida albicans* induces selectively transcriptional activation of cyclooxygenase-2 in HeLa cells: pivotal roles of Toll-like receptors, p38 mitogen-activated protein kinase, and NF-kappa B. *J Immunol* **171**: 3047-3055.
- [84] Diamond RD, Clark RA & Haudenschild CC (1980) Damage to *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae by the myeloperoxidase system and oxidative products of neutrophil metabolism in vitro. *J Clin Invest* **66**: 908-917.
- [85] Dixon DM, McNeil MM, Cohen ML, Gellin BG & La Montagne JR (1996) Fungal infections: a growing threat. *Public Health Rep* **111**: 226-235.
- [86] Douglas LJ (2002) Medical importance of biofilms in *Candida* infections. *Rev Iberoam Micol* **19**: 139-143.
- [87] Douglas LJ (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol* **11**: 30-36.
- [88] Dromer F, Chevalier R, Sendid B, *et al.* (2002) Synthetic analogues of beta-1,2 oligomannosides prevent intestinal colonization by the pathogenic yeast *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3869-3876.
- [89] Dubois C, Bissonnette E & Rola-Pleszczynski M (1989) Platelet-activating factor (PAF) enhances tumor necrosis factor production by alveolar macrophages. Prevention by PAF receptor antagonists and lipoxygenase inhibitors. *J Immunol* **143**: 964-970.
- [90] Edmond MB, Wallace SE, McClish DK, Pfaller MA, Jones RN & Wenzel RP (1999) Nosocomial bloodstream infections in United States hospitals: a three-year analysis. *Clin Infect Dis* **29**: 239-244.
- [91] Einsele H, Hebart H, Roller G, *et al.* (1997) Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* **35**: 1353-1360.
- [92] Elguezabal N, Maza JL & Ponton J (2004) Inhibition of adherence of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to a resin composite restorative dental material by salivary secretory IgA and monoclonal antibodies. *Oral Dis* **10**: 81-86.
- [93] Elguezabal N, Maza JL, Moragues MD & Ponton J (2009) Monoclonal antibody-mediated inhibition of adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to human epithelial cells. *Eur J Oral Sci* **117**: 474-478.

- [94] Erb-Downward JR & Noverr MC (2007) Characterization of prostaglandin E2 production by *Candida albicans*. *Infect Immun* **75**: 3498-3505.
- [95] Faurschou M & Borregaard N (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect* **5**: 1317-1327.
- [96] Ferlazzo G, Morandi B, D'Agostino A, Meazza R, Melioli G, Moretta A & Moretta L (2003) The interaction between NK cells and dendritic cells in bacterial infections results in rapid induction of NK cell activation and in the lysis of uninfected dendritic cells. *Eur J Immunol* **33**: 306-313.
- [97] Fernandez-Arenas E, Molero G, Nombela C, Diez-Orejas R & Gil C (2004) Contribution of the antibodies response induced by a low virulent *Candida albicans* strain in protection against systemic candidiasis. *Proteomics* **4**: 1204-1215.
- [98] Fernandez-Arenas E, Molero G, Nombela C, Diez-Orejas R & Gil C (2004) Low virulent strains of *Candida albicans*: unravelling the antigens for a future vaccine. *Proteomics* **4**: 3007-3020.
- [99] Fernandez-Arenas E, Bleck CK, Nombela C, Gil C, Griffiths G & Diez-Orejas R (2009) *Candida albicans* actively modulates intracellular membrane trafficking in mouse macrophage phagosomes. *Cell Microbiol* **11**: 560-589.
- [100] Ferrante A (1989) Tumor necrosis factor alpha potentiates neutrophil antimicrobial activity: increased fungicidal activity against *Torulopsis glabrata* and *Candida albicans* and associated increases in oxygen radical production and lysosomal enzyme release. *Infect Immun* **57**: 2115-2122.
- [101] Fidel PL, Jr. (2005) Immunity in vaginal candidiasis. *Curr Opin Infect Dis* **18**: 107-111.
- [102] Filler SG, Ibe BO, Luckett PM, Raj JU & Edwards JE, Jr. (1991) *Candida albicans* stimulates endothelial cell eicosanoid production. *J Infect Dis* **164**: 928-935.
- [103] Filler SG, Ibe BO, Ibrahim AS, Ghannoum MA, Raj JU & Edwards JE, Jr. (1994) Mechanisms by which *Candida albicans* induces endothelial cell prostaglandin synthesis. *Infect Immun* **62**: 1064-1069.
- [104] Finberg RW & Kurt-Jones EA (2006) CD14: chaperone or matchmaker? *Immunity* **24**: 127-129.
- [105] Flornes LM, Bryceson YT, Spurkland A, Lorentzen JC, Dissen E & Fossum S (2004) Identification of lectin-like receptors expressed by antigen presenting cells and neutrophils and their mapping to a novel gene complex. *Immunogenetics* **56**: 506-517.
- [106] Fonzi WA & Irwin MY (1993) Isogenic strain construction and gene mapping in *Candida albicans*. *Genetics* **134**: 717-728.
- [107] Fradin C, Poulain D & Jouault T (2000) beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* bind to a 32-kilodalton macrophage membrane protein homologous to the mammalian lectin galectin-3. *Infect Immun* **68**: 4391-4398.
- [108] Fradin C, Jouault T, Mallet A, Mallet JM, Camus D, Sinay P & Poulain D (1996) Beta-1,2-linked oligomannosides inhibit *Candida albicans* binding to murine macrophage. *J Leukoc Biol* **60**: 81-87.
- [109] Franchi L, Park JH, Shaw MH, Marina-Garcia N, Chen G, Kim YG & Nunez G (2008) Intracellular NOD-like receptors in innate immunity, infection and disease. *Cell Microbiol* **10**: 1-8.
- [110] Frehel C & Rastogi N (1987) *Mycobacterium leprae* surface components intervene in the early phagosome-lysosome fusion inhibition event. *Infect Immun* **55**: 2916-2921.
- [111] Fries BC, Goldman DL, Cherniak R, Ju R & Casadevall A (1999) Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure. *Infect Immun* **67**: 6076-6083.

- [112] Frohner IE, Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O & Kuchler K (2009) Candida albicans cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Mol Microbiol* **71**: 240-252.
- [113] Fu Y, Rieg G, Fonzi WA, Belanger PH, Edwards JE, Jr. & Filler SG (1998) Expression of the Candida albicans gene ALS1 in Saccharomyces cerevisiae induces adherence to endothelial and epithelial cells. *Infect Immun* **66**: 1783-1786.
- [114] Fusek M, Smith EA, Monod M & Foundling SI (1993) Candida parapsilosis expresses and secretes two aspartic proteinases. *FEBS Lett* **327**: 108-112.
- [115] Gacser A, Stehr F, Kroger C, Kredics L, Schafer W & Nosanchuk JD (2007) Lipase 8 affects the pathogenesis of Candida albicans. *Infect Immun* **75**: 4710-4718.
- [116] Gaforio JJ, Ortega E, Algarra I, Serrano MJ & Alvarez de Cienfuegos G (2002) NK cells mediate increase of phagocytic activity but not of proinflammatory cytokine (interleukin-6 [IL-6], tumor necrosis factor alpha, and IL-12) production elicited in splenic macrophages by tilorone treatment of mice during acute systemic candidiasis. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**: 1282-1294.
- [117] Gales A, Conduche A, Bernad J, *et al.* (2010) PPARgamma controls dectin-1 expression required for host antifungal defense against Candida albicans. *PLoS Pathog* **6**: e1000714.
- [118] Galvan BaFM (2006) Epidemiologia de la candidemia en UCI. *Rev Iberoam Micol* **23**: 12-15.
- [119] Gantner BN, Simmons RM & Underhill DM (2005) Dectin-1 mediates macrophage recognition of Candida albicans yeast but not filaments. *Embo J* **24**: 1277-1286.
- [120] Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S & Underhill DM (2003) Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med* **197**: 1107-1117.
- [121] Garber G (2001) An overview of fungal infections. *Drugs* **61 Suppl 1**: 1-12.
- [122] Garcia-Agudo R & Garcia-Martos P (2009) [Clinical and microbiological aspects of fungal peritonitis in peritoneal dialysis]. *Nefrologia* **29**: 506-517.
- [123] Gedde MM, Higgins DE, Tilney LG & Portnoy DA (2000) Role of listeriolysin O in cell-to-cell spread of Listeria monocytogenes. *Infect Immun* **68**: 999-1003.
- [124] Gedik H & Ozkan YK (2009) The effect of surface roughness of silicone-based resilient liner materials on the adherence of Candida albicans and inhibition of Candida albicans with different disinfectants. *Oral Health Prev Dent* **7**: 347-353.
- [125] Geijtenbeek TB, Krooshoop DJ, Bleijs DA, *et al.* (2000) DC-SIGN-ICAM-2 interaction mediates dendritic cell trafficking. *Nat Immunol* **1**: 353-357.
- [126] Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, *et al.* (2000) DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* **100**: 587-597.
- [127] Gelfand JA, Hurley DL, Fauci AS & Frank MM (1978) Role of complement in host defense against experimental disseminated candidiasis. *J Infect Dis* **138**: 9-16.
- [128] Geraldino TH, de Vito E, Custodio LA, *et al.* (2010) Increased tumour necrosis factor-alpha production, higher mannose receptor activity and ability to kill Candida by concanavalin-A-activated macrophages. *FEMS Immunol Med Microbiol*.
- [129] Ghaleb M, Hamad M & Abu-Elteen KH (2003) Vaginal T lymphocyte population kinetics during experimental vaginal candidosis: evidence for a possible role of CD8+ T cells in protection against vaginal candidosis. *Clin Exp Immunol* **131**: 26-33.
- [130] Ghannoum MA, Abu el-Teen K & Radwan SS (1987) Blocking adherence of Candida albicans to buccal epithelial cells by yeast glycolipids, yeast wall lipids and lipids from epithelial cells. *Mykosen* **30**: 371-378.

- [131] Ghosh S, Navarathna DH, Roberts DD, Cooper JT, Atkin AL, Petro TM & Nickerson KW (2009) Arginine-induced germ tube formation in *Candida albicans* is essential for escape from murine macrophage line RAW 264.7. *Infect Immun* **77**: 1596-1605.
- [132] Gil ML, Fradelizi D & Gozalbo D (2005) TLR2: for or against *Candida albicans*? *Trends Microbiol* **13**: 298-299; discussion 299-301.
- [133] Gilfillan GD, Sullivan DJ, Haynes K, Parkinson T, Coleman DC & Gow NA (1998) *Candida dubliniensis*: phylogeny and putative virulence factors. *Microbiology* **144** ( Pt 4): 829-838.
- [134] Gillum AM, Tsay EY & Kirsch DR (1984) Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* **198**: 179-182.
- [135] Gilmore BJ, Retsinas EM, Lorenz JS & Hostetter MK (1988) An iC3b receptor on *Candida albicans*: structure, function, and correlates for pathogenicity. *J Infect Dis* **157**: 38-46.
- [136] Girardin SE, Boneca IG, Viala J, *et al.* (2003) Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection. *J Biol Chem* **278**: 8869-8872.
- [137] Gomez J, Garcia-Vazquez E, Espinosa C, *et al.* (2009) Nosocomial candidemia at a general hospital: The change of epidemiological and clinical characteristics. A comparative study of 2 cohorts (1993-1998 versus 2002-2005). *Rev Iberoam Micol.*
- [138] Goodridge HS, Simmons RM & Underhill DM (2007) Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol* **178**: 3107-3115.
- [139] Gow NA, Netea MG, Munro CA, *et al.* (2007) Immune recognition of *Candida albicans* beta-glucan by dectin-1. *J Infect Dis* **196**: 1565-1571.
- [140] Gozalbo D, Roig P, Villamon E & Gil ML (2004) *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. *Curr Drug Targets Infect Disord* **4**: 117-135.
- [141] Graham IL, Gresham HD & Brown EJ (1989) An immobile subset of plasma membrane CD11b/CD18 (Mac-1) is involved in phagocytosis of targets recognized by multiple receptors. *J Immunol* **142**: 2352-2358.
- [142] Greenfield RA, Abrams VL, Crawford DL & Kuhls TL (1993) Effect of abrogation of natural killer cell activity on the course of candidiasis induced by intraperitoneal administration and gastrointestinal candidiasis in mice with severe combined immunodeficiency. *Infect Immun* **61**: 2520-2525.
- [143] Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van Het Hof B, van Kooyk Y & Geijtenbeek TB (2007) C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity* **26**: 605-616.
- [144] Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Wevers B, Bruijns SC & Geijtenbeek TB (2009) Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF-kappaB activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol* **10**: 203-213.
- [145] Gross O, Gewies A, Finger K, *et al.* (2006) Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature* **442**: 651-656.
- [146] Guerrero A, Jain N, Goldman DL & Fries BC (2006) Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology* **152**: 3-9.
- [147] Gutierrez J, Morales P, Gonzalez MA & Quindos G (2002) *Candida dubliniensis*, a new fungal pathogen. *J Basic Microbiol* **42**: 207-227.
- [148] Han Y, Riesselman MH & Cutler JE (2000) Protection against candidiasis by an immunoglobulin G3 (IgG3) monoclonal antibody specific for the same mannotriose as an IgM protective antibody. *Infect Immun* **68**: 1649-1654.

- [149] Han Y, Kozel TR, Zhang MX, MacGill RS, Carroll MC & Cutler JE (2001) Complement is essential for protection by an IgM and an IgG3 monoclonal antibody against experimental, hematogenously disseminated candidiasis. *J Immunol* **167**: 1550-1557.
- [150] Hara H, Ishihara C, Takeuchi A, *et al.* (2007) The adaptor protein CARD9 is essential for the activation of myeloid cells through ITAM-associated and Toll-like receptors. *Nat Immunol* **8**: 619-629.
- [151] Hawser SP & Douglas LJ (1994) Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. *Infect Immun* **62**: 915-921.
- [152] Hazen KC & Cutler JE (1979) Autoregulation of germ tube formation by *Candida albicans*. *Infect Immun* **24**: 661-666.
- [153] Hazen KC & Cutler JE (1983) Isolation and purification of morphogenic autoregulatory substance produced by *Candida albicans*. *J Biochem* **94**: 777-783.
- [154] Heinsbroek SE, Brown GD & Gordon S (2005) Dectin-1 escape by fungal dimorphism. *Trends Immunol* **26**: 352-354.
- [155] Heinsbroek SE, Taylor PR, Martinez FO, Martinez-Pomares L, Brown GD & Gordon S (2008) Stage-specific sampling by pattern recognition receptors during *Candida albicans* phagocytosis. *PLoS Pathog* **4**: e1000218.
- [156] Herent P, Stynen D, Hernando F, Fruit J & Poulain D (1992) Retrospective evaluation of two latex agglutination tests for detection of circulating antigens during invasive candidosis. *J Clin Microbiol* **30**: 2158-2164.
- [157] Herre J, Marshall AS, Caron E, *et al.* (2004) Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood* **104**: 4038-4045.
- [158] High N, Mounier J, Prevost MC & Sansonetti PJ (1992) IpaB of *Shigella flexneri* causes entry into epithelial cells and escape from the phagocytic vacuole. *Embo J* **11**: 1991-1999.
- [159] Hodgetts S, Nooney L, Al-Akeel R, Curry A, Awad S, Matthews R & Burnie J (2008) Efungumab and caspofungin: pre-clinical data supporting synergy. *J Antimicrob Chemother* **61**: 1132-1139.
- [160] Holmskov U, Thiel S & Jensenius JC (2003) Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. *Annu Rev Immunol* **21**: 547-578.
- [161] Holmskov U, Malhotra R, Sim RB & Jensenius JC (1994) Collectins: collagenous C-type lectins of the innate immune defense system. *Immunol Today* **15**: 67-74.
- [162] Honderlick P, Gravisse J, Cahen P & Vignon D (2007) [Is there a change in ecology of *Candida* species incriminated in fungemia? A 7 years study at Foch Hospital]. *Pathol Biol (Paris)* **55**: 531-533.
- [163] Hoover CI, Jantapour MJ, Newport G, Agabian N & Fisher SJ (1998) Cloning and regulated expression of the *Candida albicans* phospholipase B (PLB1) gene. *FEMS Microbiol Lett* **167**: 163-169.
- [164] Hornby JM & Nickerson KW (2004) Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. *Antimicrob Agents Chemother* **48**: 2305-2307.
- [165] Hornby JM, Jensen EC, Lisek AD, *et al.* (2001) Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2982-2992.
- [166] Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, *et al.* (2002) Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol* **168**: 4531-4537.
- [167] Hostetter MK (1994) Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev* **7**: 29-42.
- [168] Hoyer LL (2001) The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* **9**: 176-180.

- [169] Hoyer LL & Hecht JE (2001) The ALS5 gene of *Candida albicans* and analysis of the Als5p N-terminal domain. *Yeast* **18**: 49-60.
- [170] Hoyer LL, Green CB, Oh SH & Zhao X (2008) Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit. *Med Mycol* **46**: 1-15.
- [171] Hoyer LL, Fundyga R, Hecht JE, Kapteyn JC, Klis FM & Arnold J (2001) Characterization of agglutinin-like sequence genes from non-*albicans* *Candida* and phylogenetic analysis of the ALS family. *Genetics* **157**: 1555-1567.
- [172] Hsu YM, Zhang Y, You Y, *et al.* (2007) The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat Immunol* **8**: 198-205.
- [173] Huang W, Na L, Fidel PL & Schwarzenberger P (2004) Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice. *J Infect Dis* **190**: 624-631.
- [174] Hube B (1996) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases. *Curr Top Med Mycol* **7**: 55-69.
- [175] Hube B (2000) Extracellular proteinases of human pathogenic fungi. *Contrib Microbiol* **5**: 126-137.
- [176] Hube B & Naglik J (2001) *Candida albicans* proteinases: resolving the mystery of a gene family. *Microbiology* **147**: 1997-2005.
- [177] Hube B, Stehr F, Bossenz M, Mazur A, Kretschmar M & Schafer W (2000) Secreted lipases of *Candida albicans*: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members. *Arch Microbiol* **174**: 362-374.
- [178] Hube B, Hess D, Baker CA, Schaller M, Schafer W & Dolan JW (2001) The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. *Microbiology* **147**: 879-889.
- [179] Huffnagle GB & Deepe GS (2003) Innate and adaptive determinants of host susceptibility to medically important fungi. *Curr Opin Microbiol* **6**: 344-350.
- [180] Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, *et al.* (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**: 599-603.
- [181] Hull CM & Johnson AD (1999) Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast *Candida albicans*. *Science* **285**: 1271-1275.
- [182] Hull CM, Raisner RM & Johnson AD (2000) Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host. *Science* **289**: 307-310.
- [183] Iyata-Ombetta S, Jouault T, Trinel PA & Poulain D (2001) Role of extracellular signal-regulated protein kinase cascade in macrophage killing of *Candida albicans*. *J Leukoc Biol* **70**: 149-154.
- [184] Iyata-Ombetta S, Idziorek T, Trinel PA, Poulain D & Jouault T (2003) Role of phospholipomannan in *Candida albicans* escape from macrophages and induction of cell apoptosis through regulation of bad phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* **1010**: 573-576.
- [185] Iyata-Ombetta S, Idziorek T, Trinel PA, Poulain D & Jouault T (2003) *Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis. *J Biol Chem* **278**: 13086-13093.
- [186] Im SY, Choi JH, Ko HM, Han SJ, Chun SB, Lee HK & Ha TY (1997) A protective role of platelet-activating factor in murine candidiasis. *Infect Immun* **65**: 1321-1326.
- [187] Inohara, Chamaillard, McDonald C & Nunez G (2005) NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* **74**: 355-383.
- [188] Inohara N, Ogura Y, Chen FF, Muto A & Nunez G (2001) Human Nod1 confers responsiveness to bacterial lipopolysaccharides. *J Biol Chem* **276**: 2551-2554.
- [189] Jain N, Guerrero A & Fries BC (2006) Phenotypic switching and its implications for the pathogenesis of *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Yeast Res* **6**: 480-488.

- [190] Janeway CA, P. Traveres, M. Walportand M.J. Shlomchick (2003) *Inmunobiologica*. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. *Elsevier-Masson* **2nd ed**.
- [191] Janssens S & Beyaert R (2002) A universal role for MyD88 in TLR/IL-1R-mediated signaling. *Trends Biochem Sci* **27**: 474-482.
- [192] Jawhara S, Thuru X, Standaert-Vitse A, *et al.* (2008) Colonization of mice by *Candida albicans* is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J Infect Dis* **197**: 972-980.
- [193] Jayatilake JA, Samaranayake YH & Samaranayake LP (2005) An ultrastructural and a cytochemical study of candidal invasion of reconstituted human oral epithelium. *J Oral Pathol Med* **34**: 240-246.
- [194] Joly S, Maze C, McCray PB, Jr. & Guthmiller JM (2004) Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms. *J Clin Microbiol* **42**: 1024-1029.
- [195] Jongstra-Bilen J, Harrison R & Grinstein S (2003) Fcγ-receptors induce Mac-1 (CD11b/CD18) mobilization and accumulation in the phagocytic cup for optimal phagocytosis. *J Biol Chem* **278**: 45720-45729.
- [196] Jouault T, Fradin C, Trinel PA & Poulain D (2000) *Candida albicans*-derived beta-1,2-linked manooligosaccharides induce desensitization of macrophages. *Infect Immun* **68**: 965-968.
- [197] Jouault T, Bernigaud A, Lepage G, Trinel PA & Poulain D (1994) The *Candida albicans* phospholipomannan induces in vitro production of tumour necrosis factor-α from human and murine macrophages. *Immunology* **83**: 268-273.
- [198] Jouault T, Fradin C, Trinel PA, Bernigaud A & Poulain D (1998) Early signal transduction induced by *Candida albicans* in macrophages through shedding of a glycolipid. *J Infect Dis* **178**: 792-802.
- [199] Jouault T, Sarazin A, Martinez-Esparza M, Fradin C, Sendid B & Poulain D (2009) Host responses to a versatile commensal: PAMPs and PRRs interplay leading to tolerance or infection by *Candida albicans*. *Cell Microbiol* **11**: 1007-1015.
- [200] Jouault T, Lepage G, Bernigaud A, *et al.* (1995) Beta-1,2-linked oligomannosides from *Candida albicans* act as signals for tumor necrosis factor α production. *Infect Immun* **63**: 2378-2381.
- [201] Jouault T, Iyata-Ombetta S, Takeuchi O, *et al.* (2003) *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis* **188**: 165-172.
- [202] Jouault T, El Abed-El Behi M, Martinez-Esparza M, *et al.* (2006) Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol* **177**: 4679-4687.
- [203] Jouault T, Fradin C, Dzierszinski F, *et al.* (2001) Peptides that mimic *Candida albicans*-derived beta-1,2-linked mannosides. *Glycobiology* **11**: 693-701.
- [204] Kalkanci A, Kustimur S, Timlioglu O & Uluoglu C (2002) The role of tumour necrosis factor-α (TNF-α) and platelet-activating factor (PAF) interaction on murine candidosis. *Mycoses* **45**: 79-83.
- [205] Kalo-Klein A & Witkin SS (1990) Prostaglandin E2 enhances and gamma interferon inhibits germ tube formation in *Candida albicans*. *Infect Immun* **58**: 260-262.
- [206] Kanbe T & Cutler JE (1994) Evidence for adhesin activity in the acid-stable moiety of the phosphomannoprotein cell wall complex of *Candida albicans*. *Infect Immun* **62**: 1662-1668.
- [207] Kanbe T, Han Y, Redgrave B, Riesselman MH & Cutler JE (1993) Evidence that mannans of *Candida albicans* are responsible for adherence of yeast forms to spleen and lymph node tissue. *Infect Immun* **61**: 2578-2584.

- [208] Kaposzta R, Tree P, Marodi L & Gordon S (1998) Characteristics of invasive candidiasis in gamma interferon- and interleukin-4-deficient mice: role of macrophages in host defense against *Candida albicans*. *Infect Immun* **66**: 1708-1717.
- [209] Kaposzta R, Marodi L, Hollinshead M, Gordon S & da Silva RP (1999) Rapid recruitment of late endosomes and lysosomes in mouse macrophages ingesting *Candida albicans*. *J Cell Sci* **112** ( Pt 19): 3237-3248.
- [210] Kapteyn JC, Van Den Ende H & Klis FM (1999) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 373-383.
- [211] Kapteyn JC, Hoyer LL, Hecht JE, *et al.* (2000) The cell wall architecture of *Candida albicans* wild-type cells and cell wall-defective mutants. *Mol Microbiol* **35**: 601-611.
- [212] Karbassi A, Becker JM, Foster JS & Moore RN (1987) Enhanced killing of *Candida albicans* by murine macrophages treated with macrophage colony-stimulating factor: evidence for augmented expression of mannose receptors. *J Immunol* **139**: 417-421.
- [213] Kawai T & Akira S (2007) Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med* **13**: 460-469.
- [214] Kawai T & Akira S (2007) TLR signaling. *Semin Immunol* **19**: 24-32.
- [215] Kawai T, Adachi O, Ogawa T, Takeda K & Akira S (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity* **11**: 115-122.
- [216] Kim HA, Kim SH, Ko HM, *et al.* (2008) Nitric oxide plays a key role in the platelet-activating factor-induced enhancement of resistance against systemic candidiasis. *Immunology* **124**: 428-435.
- [217] Kim HS, Choi EH, Khan J, *et al.* (2005) Expression of genes encoding innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Candida albicans*. *Infect Immun* **73**: 3714-3724.
- [218] King AG, Johanson K, Frey CL, *et al.* (2000) Identification of unique truncated KC/GRO beta chemokines with potent hematopoietic and anti-infective activities. *J Immunol* **164**: 3774-3782.
- [219] Kirsch DR, Kelly R & Kurtz MB (1990) *The Genetics of Candida. 1 st ed.* CRC Press.
- [220] Klis FM (1994) Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**: 851-869.
- [221] Klotz SA, Hein RC, Smith RL & Rouse JB (1994) The fibronectin adhesin of *Candida albicans*. *Infect Immun* **62**: 4679-4681.
- [222] Koehler L, Nettelbreker E, Hudson AP, *et al.* (1997) Ultrastructural and molecular analyses of the persistence of *Chlamydia trachomatis* (serovar K) in human monocytes. *Microb Pathog* **22**: 133-142.
- [223] Koh AY, Kohler JR, Coggshall KT, Van Rooijen N & Pier GB (2008) Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog* **4**: e35.
- [224] Kohatsu L, Hsu DK, Jegalian AG, Liu FT & Baum LG (2006) Galectin-3 induces death of *Candida* species expressing specific beta-1,2-linked mannans. *J Immunol* **177**: 4718-4726.
- [225] Kohno S (1991) Serological diagnosis of deep-seated mycosis. *Asian Med. J.* **34**.
- [226] Kojic EM & Darouiche RO (2004) *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* **17**: 255-267.
- [227] Kozel TR (1996) Activation of the complement system by pathogenic fungi. *Clin Microbiol Rev* **9**: 34-46.
- [228] Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K & Muller W (1993) Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**: 263-274.

- [229] Kullberg BJ, Netea MG, Vonk AG & van der Meer JW (1999) Modulation of neutrophil function in host defense against disseminated *Candida albicans* infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **26**: 299-307.
- [230] Kunkel SL, Spengler M, May MA, Spengler R, Larrick J & Remick D (1988) Prostaglandin E2 regulates macrophage-derived tumor necrosis factor gene expression. *J Biol Chem* **263**: 5380-5384.
- [231] Kurtulmus H, Kumbuloglu O, Ozcan M, Ozdemir G & Vural C (2010) *Candida albicans* adherence on silicone elastomers: effect of polymerisation duration and exposure to simulated saliva and nasal secretion. *Dent Mater* **26**: 76-82.
- [232] Kvaal C, Lachke SA, Srikantha T, Daniels K, McCoy J & Soll DR (1999) Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun* **67**: 6652-6662.
- [233] Lanier LL (2003) Natural killer cell receptor signaling. *Curr Opin Immunol* **15**: 308-314.
- [234] Lanier LL (2005) NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* **23**: 225-274.
- [235] Lanier LL (2008) Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol* **9**: 495-502.
- [236] Latz E, Visintin A, Lien E, *et al.* (2002) Lipopolysaccharide rapidly traffics to and from the Golgi apparatus with the toll-like receptor 4-MD-2-CD14 complex in a process that is distinct from the initiation of signal transduction. *J Biol Chem* **277**: 47834-47843.
- [237] Le Cabec V, Emorine LJ, Toesca I, Cougoule C & Maridonneau-Parini I (2005) The human macrophage mannose receptor is not a professional phagocytic receptor. *J Leukoc Biol* **77**: 934-943.
- [238] Lee HK, Dunzendorfer S, Soldau K & Tobias PS (2006) Double-stranded RNA-mediated TLR3 activation is enhanced by CD14. *Immunity* **24**: 153-163.
- [239] Lee KH, Yoon MS & Chun WH (1997) The effects of monoclonal antibodies against iC3b receptors in mice with experimentally induced disseminated candidiasis. *Immunology* **92**: 104-110.
- [240] Lee KK, Yu L, Macdonald DL, Paranchych W, Hodges RS & Irvin RT (1996) Anti-adhesin antibodies that recognize a receptor-binding motif (adhesintope) inhibit pilus/fimbrial-mediated adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* to asialo-GM1 receptors and human buccal epithelial cell surface receptors. *Can J Microbiol* **42**: 479-486.
- [241] Lee SJ, Zheng NY, Clavijo M & Nussenzweig MC (2003) Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice. *Infect Immun* **71**: 437-445.
- [242] Lehrer RI (2004) Primate defensins. *Nat Rev Microbiol* **2**: 727-738.
- [243] LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, *et al.* (2007) Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* **8**: 630-638.
- [244] Leroy O, Gangneux JP, Montravers P, *et al.* (2009) Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006). *Crit Care Med* **37**: 1612-1618.
- [245] Li M, Chen Q, Shen Y & Liu W (2009) *Candida albicans* phospholipomannan triggers inflammatory responses of human keratinocytes through Toll-like receptor 2. *Exp Dermatol* **18**: 603-610.
- [246] Li RK & Cutler JE (1993) Chemical definition of an epitope/adhesin molecule on *Candida albicans*. *J Biol Chem* **268**: 18293-18299.

- [247] Lima-Neto RG, Beltrao EI, Oliveira PC & Neves RP (2009) Adherence of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* to epithelial cells correlates with fungal cell surface carbohydrates. *Mycoses*.
- [248] Linehan SA, Martinez-Pomares L, Stahl PD & Gordon S (1999) Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells. *J Exp Med* **189**: 1961-1972.
- [249] Lingappa BT, Prasad M, Lingappa Y, Hunt DF & Biemann K (1969) Phenethyl alcohol and tryptophol: autoantibiotics produced by the fungus *Candida albicans*. *Science* **163**: 192-194.
- [250] Liu L, Kang K, Takahara M, Cooper KD & Ghannoum MA (2001) Hyphae and yeasts of *Candida albicans* differentially regulate interleukin-12 production by human blood monocytes: inhibitory role of *C. albicans* germination. *Infect Immun* **69**: 4695-4697.
- [251] Lo HJ, Kohler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A & Fink GR (1997) Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* **90**: 939-949.
- [252] Lopez-Ribot JL (2005) *Candida albicans* biofilms: more than filamentation. *Curr Biol* **15**: R453-455.
- [253] Lorenz MC & Fink GR (2002) Life and death in a macrophage: role of the glyoxylate cycle in virulence. *Eukaryot Cell* **1**: 657-662.
- [254] Ma L, Xie L, Dong X & Shi W (2009) Role of extracellular phospholipase B of *Candida albicans* as a virulent factor in experimental keratomycosis. *Curr Eye Res* **34**: 761-768.
- [255] Manning M & Mitchell TG (1980) Morphogenesis of *Candida albicans* and cytoplasmic proteins associated with differences in morphology, strain, or temperature. *J Bacteriol* **144**: 258-273.
- [256] Mansour MK & Levitz SM (2002) Interactions of fungi with phagocytes. *Curr Opin Microbiol* **5**: 359-365.
- [257] Marcil A, Harcus D, Thomas DY & Whiteway M (2002) *Candida albicans* killing by RAW 264.7 mouse macrophage cells: effects of *Candida* genotype, infection ratios, and gamma interferon treatment. *Infect Immun* **70**: 6319-6329.
- [258] Marcil A, Gadoury C, Ash J, Zhang J, Nantel A & Whiteway M (2008) Analysis of PRA1 and its relationship to *Candida albicans*-macrophage interactions. *Infect Immun* **76**: 4345-4358.
- [259] Marodi L & Johnston RB, Jr. (1993) Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. *Immunodeficiency* **4**: 181-185.
- [260] Marodi L, Korchak HM & Johnston RB, Jr. (1991) Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages. *J Immunol* **146**: 2783-2789.
- [261] Martinez-Esparza M, Sarazin A, Poulain D & Jouault T (2009) A method for examining glycans surface expression of yeasts by flow cytometry. *Methods Mol Biol* **470**: 85-94.
- [262] Martinez-Esparza M, Sarazin A, Jouy N, Poulain D & Jouault T (2006) Comparative analysis of cell wall surface glycan expression in *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae* yeasts by flow cytometry. *J Immunol Methods* **314**: 90-102.
- [263] Matsuzaki G & Umemura M (2007) Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol* **51**: 1139-1147.
- [264] Matthews R & Burnie J (1988) Diagnosis of systemic candidiasis by an enzyme-linked dot immunobinding assay for a circulating immunodominant 47-kilodalton antigen. *J Clin Microbiol* **26**: 459-463.

- [265] Matthews R & Burnie J (1992) The role of hsp90 in fungal infection. *Immunol Today* **13**: 345-348.
- [266] Matthews R & Burnie J (1992) Acquired immunity to systemic candidiasis in immunodeficient mice: role of antibody to heat-shock protein 90. *J Infect Dis* **166**: 1193-1195.
- [267] Matthews R & Burnie J (2001) Antifungal antibodies: a new approach to the treatment of systemic candidiasis. *Curr Opin Investig Drugs* **2**: 472-476.
- [268] Matthews R, Hodgetts S & Burnie J (1995) Preliminary assessment of a human recombinant antibody fragment to hsp90 in murine invasive candidiasis. *J Infect Dis* **171**: 1668-1671.
- [269] Matthews RC, Burnie JP, Howat D, Rowland T & Walton F (1991) Autoantibody to heat-shock protein 90 can mediate protection against systemic candidosis. *Immunology* **74**: 20-24.
- [270] Matthews RC, Rigg G, Hodgetts S, *et al.* (2003) Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90. *Antimicrob Agents Chemother* **47**: 2208-2216.
- [271] McGreal EP, Rosas M, Brown GD, *et al.* (2006) The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology* **16**: 422-430.
- [272] Mencacci A, Cenci E, Bistoni F, *et al.* (1998) Specific and non-specific immunity to *Candida albicans*: a lesson from genetically modified animals. *Res Immunol* **149**: 352-361; discussion 517-359.
- [273] Mencacci A, Cenci E, Del Sero G, *et al.* (1998) IL-10 is required for development of protective Th1 responses in IL-12-deficient mice upon *Candida albicans* infection. *J Immunol* **161**: 6228-6237.
- [274] Mencacci A, Cenci E, Del Sero G, *et al.* (1998) Defective co-stimulation and impaired Th1 development in tumor necrosis factor/lymphotoxin-alpha double-deficient mice infected with *Candida albicans*. *Int Immunol* **10**: 37-48.
- [275] Meyer JE, Harder J, Gorogh T, Weise JB, Schubert S, Janssen D & Maune S (2004) Human beta-defensin-2 in oral cancer with opportunistic *Candida* infection. *Anticancer Res* **24**: 1025-1030.
- [276] Mille C, Janbon G, Delplace F, *et al.* (2004) Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation. *J Biol Chem* **279**: 47952-47960.
- [277] Miller MG & Johnson AD (2002) White-opaque switching in *Candida albicans* is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating. *Cell* **110**: 293-302.
- [278] Miyakawa Y, Kagaya K, Kuribayashi T, Suzuki M & Fukazawa Y (1989) Isolation and chemical and biological characterization of antigenic mutants of *Candida albicans* serotype A. *Yeast* **5 Spec No**: S225-229.
- [279] Miyakawa Y, Kuribayashi T, Kagaya K, Suzuki M, Nakase T & Fukazawa Y (1992) Role of specific determinants in mannan of *Candida albicans* serotype A in adherence to human buccal epithelial cells. *Infect Immun* **60**: 2493-2499.
- [280] Monod M, Togni G, Hube B & Sanglard D (1994) Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species. *Mol Microbiol* **13**: 357-368.
- [281] Montagnoli C, Bacci A, Bozza S, Gaziano R, Mosci P, Sharpe AH & Romani L (2002) B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*. *J Immunol* **169**: 6298-6308.
- [282] Montagnoli C, Bozza S, Bacci A, *et al.* (2003) A role for antibodies in the generation of memory antifungal immunity. *Eur J Immunol* **33**: 1193-1204.

- [283] Muller A, Rice PJ, Ensley HE, *et al.* (1996) Receptor binding and internalization of a water-soluble (1->3)-beta-D-glucan biologic response modifier in two monocyte/macrophage cell lines. *J Immunol* **156**: 3418-3425.
- [284] Mullick A, Elias M, Picard S, *et al.* (2004) Dysregulated inflammatory response to *Candida albicans* in a C5-deficient mouse strain. *Infect Immun* **72**: 5868-5876.
- [285] Munro CA, Bates S, Buurman ET, *et al.* (2005) Mnt1p and Mnt2p of *Candida albicans* are partially redundant alpha-1,2-mannosyltransferases that participate in O-linked mannosylation and are required for adhesion and virulence. *J Biol Chem* **280**: 1051-1060.
- [286] Murciano C, Villamon E, O'Connor JE, Gozalbo D & Gil ML (2006) Killed *Candida albicans* yeasts and hyphae inhibit gamma interferon release by murine natural killer cells. *Infect Immun* **74**: 1403-1406.
- [287] Murciano C, Yanez A, O'Connor JE, Gozalbo D & Gil ML (2008) Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **53**: 214-221.
- [288] Naderer T & McConville MJ (2008) The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol* **10**: 301-308.
- [289] Nagaoka K, Takahara K, Tanaka K, *et al.* (2005) Association of SIGNR1 with TLR4-MD-2 enhances signal transduction by recognition of LPS in gram-negative bacteria. *Int Immunol* **17**: 827-836.
- [290] Nagi-Miura N, Shingo Y, Kurihara K, Adachi Y, Suzuki K & Ohno N (2007) Involvement of platelet activating factor, histamine and serotonin in acute lethal shock induced by *Candida albicans* water-soluble extracellular polysaccharide fraction (CAWS) in mice. *Biol Pharm Bull* **30**: 1354-1357.
- [291] Naglik JR, Challacombe SJ & Hube B (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**: 400-428, table of contents.
- [292] Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, *et al.* (2003) Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *J Infect Dis* **188**: 469-479.
- [293] Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, *et al.* (2002) Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* **17**: 375-387.
- [294] Narumiya S, Sugimoto Y & Ushikubi F (1999) Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* **79**: 1193-1226.
- [295] Nathan C (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol* **6**: 173-182.
- [296] Navarathna DH, Nickerson KW, Duhamel GE, Jerrels TR & Petro TM (2007) Exogenous farnesol interferes with the normal progression of cytokine expression during candidiasis in a mouse model. *Infect Immun* **75**: 4006-4011.
- [297] Navarathna DH, Hornby JM, Krishnan N, Parkhurst A, Duhamel GE & Nickerson KW (2007) Effect of farnesol on a mouse model of systemic candidiasis, determined by use of a DPP3 knockout mutant of *Candida albicans*. *Infect Immun* **75**: 1609-1618.
- [298] Netea MG, van de Veerdonk F, Verschueren I, van der Meer JW & Kullberg BJ (2008) Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**: 118-123.
- [299] Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschueren I, Van Der Meer JW & Kullberg BJ (2002) The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* **185**: 1483-1489.
- [300] Netea MG, Blok WL, Kullberg BJ, Bemelmans M, Vogels MT, Buurman WA & van der Meer JW (1995) Pharmacologic inhibitors of tumor necrosis factor production exert

- differential effects in lethal endotoxemia and in infection with live microorganisms in mice. *J Infect Dis* **171**: 393-399.
- [301] Netea MG, Gijzen K, Coolen N, *et al.* (2004) Human dendritic cells are less potent at killing *Candida albicans* than both monocytes and macrophages. *Microbes Infect* **6**: 985-989.
- [302] Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, *et al.* (2004) Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* **172**: 3712-3718.
- [303] Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, *et al.* (2005) Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J Immunol* **174**: 6518-6523.
- [304] Netea MG, Gow NA, Munro CA, *et al.* (2006) Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest* **116**: 1642-1650.
- [305] Newman SL & Holly A (2001) *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *Infect Immun* **69**: 6813-6822.
- [306] Nickerson KW, Atkin AL & Hornby JM (2006) Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond. *Appl Environ Microbiol* **72**: 3805-3813.
- [307] Nisini R, Romagnoli G, Gomez MJ, *et al.* (2001) Antigenic properties and processing requirements of 65-kilodalton mannoprotein, a major antigen target of anti-*Candida* human T-cell response, as disclosed by specific human T-cell clones. *Infect Immun* **69**: 3728-3736.
- [308] Noverr MC, Erb-Downward JR & Huffnagle GB (2003) Production of eicosanoids and other oxylipins by pathogenic eukaryotic microbes. *Clin Microbiol Rev* **16**: 517-533.
- [309] Nucci M & Anaissie E (2001) Revisiting the source of candidemia: skin or gut? *Clin Infect Dis* **33**: 1959-1967.
- [310] O'Garra A & Vieira P (2004) Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat Med* **10**: 801-805.
- [311] Odds FC (2000) Pathogenic fungi in the 21st century. *Trends Microbiol* **8**: 200-201.
- [312] Odds FC (2010) Molecular phylogenetics and epidemiology of *Candida albicans*. *Future Microbiol* **5**: 67-79.
- [313] Odds FC, Webster CE, Mayuranathan P & Simmons PD (1988) *Candida* concentrations in the vagina and their association with signs and symptoms of vaginal candidosis. *J Med Vet Mycol* **26**: 277-283.
- [314] Oh KB, Miyazawa H, Naito T & Matsuoka H (2001) Purification and characterization of an autoregulatory substance capable of regulating the morphological transition in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4664-4668.
- [315] Ohta M, Okada M, Yamashina I & Kawasaki T (1990) The mechanism of carbohydrate-mediated complement activation by the serum mannan-binding protein. *J Biol Chem* **265**: 1980-1984.
- [316] Ozment-Skelton TR, deFluiter EA, Ha T, *et al.* (2009) Leukocyte Dectin-1 expression is differentially regulated in fungal versus polymicrobial sepsis. *Crit Care Med* **37**: 1038-1045.
- [317] Pachl J, Svoboda P, Jacobs F, *et al.* (2006) A randomized, blinded, multicenter trial of lipid-associated amphotericin B alone versus in combination with an antibody-based inhibitor of heat shock protein 90 in patients with invasive candidiasis. *Clin Infect Dis* **42**: 1404-1413.
- [318] Pagano L, Caira M, Candoni A, *et al.* (2006) The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* **91**: 1068-1075.

- [319] Palm NW & Medzhitov R (2009) Pattern recognition receptors and control of adaptive immunity. *Immunol Rev* **227**: 221-233.
- [320] Paraje MG, Correa SG, Albesa I & Sotomayor CE (2009) Lipase of *Candida albicans* induces activation of NADPH oxidase and L-arginine pathways on resting and activated macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* **390**: 263-268.
- [321] Pedreno Y, Gonzalez-Parraga P, Martinez-Esparza M, Sentandreu R, Valentin E & Arguelles JC (2007) Disruption of the *Candida albicans* ATC1 gene encoding a cell-linked acid trehalase decreases hypha formation and infectivity without affecting resistance to oxidative stress. *Microbiology* **153**: 1372-1381.
- [322] Peman J, Canton E & Gobernado M (2005) Epidemiology and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from blood: results of a 2-year multicentre study in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **24**: 23-30.
- [323] Pfaller MA & Diekema DJ (2007) Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev* **20**: 133-163.
- [324] Phan QT, Myers CL, Fu Y, *et al.* (2007) Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol* **5**: e64.
- [325] Pieters J (2008) Mycobacterium tuberculosis and the macrophage: maintaining a balance. *Cell Host Microbe* **3**: 399-407.
- [326] Pietrella D, Lupo P, Rachini A, *et al.* (2008) A *Candida albicans* mannoprotein deprived of its mannan moiety is efficiently taken up and processed by human dendritic cells and induces T-cell activation without stimulating proinflammatory cytokine production. *Infect Immun* **76**: 4359-4367.
- [327] Pilatz S, Breitbach K, Hein N, *et al.* (2006) Identification of *Burkholderia pseudomallei* genes required for the intracellular life cycle and in vivo virulence. *Infect Immun* **74**: 3576-3586.
- [328] Pittet D, Tarara D & Wenzel RP (1994) Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *Jama* **271**: 1598-1601.
- [329] Pitzurra L, Polonelli L, Cantelli C, Gerloni M, Ponton J, Bikandi J & Blasi E (1996) *Candida albicans* stress mannoprotein, SMP200, enhances tumour necrosis factor secretion in the murine macrophage cell line ANA-1. *J Med Vet Mycol* **34**: 219-222.
- [330] Porcaro I, Vidal M, Jouvert S, Stahl PD & Giaimis J (2003) Mannose receptor contribution to *Candida albicans* phagocytosis by murine E-clone J774 macrophages. *J Leukoc Biol* **74**: 206-215.
- [331] Poulain D (2000) Physiopathologie et diagnostic des candidoses systémiques. *La lettre de l'infectiologue* **5**: 182-190.
- [332] Poulain D (2003) Physiopathologie des Candidoses Systémiques. *Annales de l'Institut Pasteur*.
- [333] Poulain D & Jouault T (2004) *Candida albicans* cell wall glycans, host receptors and responses: elements for a decisive crosstalk. *Curr Opin Microbiol* **7**: 342-349.
- [334] Poulain D, Mackenzie DW & Van Cutsem J (1991) Monoclonal antibody-gold silver staining dot assay for the detection of antigenaemia in candidosis. *Mycoses* **34**: 221-226.
- [335] Poulain D, Slomianny C, Jouault T, Gomez JM & Trinel PA (2002) Contribution of phospholipomannan to the surface expression of beta-1,2-oligomannosides in *Candida albicans* and its presence in cell wall extracts. *Infect Immun* **70**: 4323-4328.
- [336] Poulain D, Faille C, Delaunoy C, Jacquinet PM, Trinel PA & Camus D (1993) Probable presence of beta(1-2)-linked oligomannosides that act as human immunoglobulin G3 epitopes and are distributed over a *Candida albicans* 14- to 18-kilodalton antigen. *Infect Immun* **61**: 1164-1166.

- [337] Pugh D & Cawson RA (1977) The cytochemical localization of phospholipase in *Candida albicans* infecting the chick chorio-allantoic membrane. *Sabouraudia* **15**: 29-35.
- [338] Rabinovich GA & Gruppi A (2005) Galectins as immunoregulators during infectious processes: from microbial invasion to the resolution of the disease. *Parasite Immunol* **27**: 103-114.
- [339] Ramage G, VandeWalle K, Lopez-Ribot JL & Wickes BL (2002) The filamentation pathway controlled by the Efg1 regulator protein is required for normal biofilm formation and development in *Candida albicans*. *FEMS Microbiol Lett* **214**: 95-100.
- [340] Raullet DH (2004) Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat Immunol* **5**: 996-1002.
- [341] Ray K, Marteyn B, Sansonetti PJ & Tang CM (2009) Life on the inside: the intracellular lifestyle of cytosolic bacteria. *Nat Rev Microbiol* **7**: 333-340.
- [342] Reiss E, Hearn VM, Poulain D & Shepherd MG (1992) Structure and function of the fungal cell wall. *J Med Vet Mycol* **30 Suppl 1**: 143-156.
- [343] Rementeria A, Abaitua F, Garcia-Tobalina R, Hernando F, Ponton J & Sevilla MJ (1997) Resistance to candidiasis and macrophage activity in chitin-treated mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* **19**: 223-230.
- [344] Reschner A, Hubert P, Delvenne P, Boniver J & Jacobs N (2008) Innate lymphocyte and dendritic cell cross-talk: a key factor in the regulation of the immune response. *Clin Exp Immunol* **152**: 219-226.
- [345] Richardson MD (2005) Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J Antimicrob Chemother* **56 Suppl 1**: i5-i11.
- [346] Rizzetto L, Kuka M, De Filippo C, *et al.* (2010) Differential IL-17 Production and Mannan Recognition Contribute to Fungal Pathogenicity and Commensalism. *J Immunol*.
- [347] Robert R, Mahaza C, Marot-Leblond A, Tronchin G & Senet JM (1991) Binding of mouse fibrinogen to *Candida albicans* in vivo. *FEMS Microbiol Lett* **62**: 301-303.
- [348] Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, *et al.* (2009) Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med* **206**: 2037-2051.
- [349] Rodriguez D, Almirante B, Cuenca-Estrella M, *et al.* (2010) Predictors of Non-albicans *Candida* Species Candidemia: Results of a Population-Based Surveillance in Barcelona, Spain. *Clin Microbiol Infect*.
- [350] Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, *et al.* (2005) Syk-dependent cytokine induction by Dectin-1 reveals a novel pattern recognition pathway for C type lectins. *Immunity* **22**: 507-517.
- [351] Roilides E, Katsifa H, Tsaparidou S, Stergiopoulou T, Panteliadis C & Walsh TJ (2000) Interleukin 10 suppresses phagocytic and antihyphal activities of human neutrophils. *Cytokine* **12**: 379-387.
- [352] Romani L (2004) Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* **4**: 1-23.
- [353] Romani L & Puccetti P (2006) Protective tolerance to fungi: the role of IL-10 and tryptophan catabolism. *Trends Microbiol* **14**: 183-189.
- [354] Romani L & Puccetti P (2007) Controlling pathogenic inflammation to fungi. *Expert Rev Anti Infect Ther* **5**: 1007-1017.
- [355] Romani L, Bistoni F & Puccetti P (2002) Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence. *Trends Microbiol* **10**: 508-514.
- [356] Romani L, Cenci E, Mencacci A, Spaccapelo R, Grohmann U, Puccetti P & Bistoni F (1992) Gamma interferon modifies CD4+ subset expression in murine candidiasis. *Infect Immun* **60**: 4950-4952.

- [357] Romani L, Mencacci A, Grohmann U, Mocci S, Mosci P, Puccetti P & Bistoni F (1992) Neutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis. *J Exp Med* **176**: 19-25.
- [358] Romani L, Mencacci A, Cenci E, *et al.* (1993) Natural killer cells do not play a dominant role in CD4<sup>+</sup> subset differentiation in *Candida albicans*-infected mice. *Infect Immun* **61**: 3769-3774.
- [359] Romani L, Montagnoli C, Bozza S, *et al.* (2004) The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells determines the full range of host immune relationships with *Candida albicans*. *Int Immunol* **16**: 149-161.
- [360] Ross GD, Cain JA & Lachmann PJ (1985) Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J Immunol* **134**: 3307-3315.
- [361] Roth MG (2004) Phosphoinositides in constitutive membrane traffic. *Physiol Rev* **84**: 699-730.
- [362] Rubin-Bejerano I, Abeijon C, Magnelli P, Grisafi P & Fink GR (2007) Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe* **2**: 55-67.
- [363] Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentin E & Sentandreu R (2006) Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res* **6**: 14-29.
- [364] Saidi S, Luitaud C & Rouabhia M (2006) In vitro synergistic effect of farnesol and human gingival cells against *Candida albicans*. *Yeast* **23**: 673-687.
- [365] Saijo S, Fujikado N, Furuta T, *et al.* (2007) Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol* **8**: 39-46.
- [366] Sallusto F, Cella M, Danieli C & Lanzavecchia A (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* **182**: 389-400.
- [367] Sandini S, La Valle R, De Bernardis F, Macri C & Cassone A (2007) The 65 kDa mannoprotein gene of *Candida albicans* encodes a putative beta-glucanase adhesin required for hyphal morphogenesis and experimental pathogenicity. *Cell Microbiol* **9**: 1223-1238.
- [368] Santos MA, Keith G & Tuite MF (1993) Non-standard translational events in *Candida albicans* mediated by an unusual seryl-tRNA with a 5'-CAG-3' (leucine) anticodon. *Embo J* **12**: 607-616.
- [369] Sato K, Yang XL, Yudate T, *et al.* (2006) 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* **281**: 38854-38866.
- [370] Schaller M, Borelli C, Korting HC & Hube B (2005) Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses* **48**: 365-377.
- [371] Schaller M, Schackert C, Korting HC, Januschke E & Hube B (2000) Invasion of *Candida albicans* correlates with expression of secreted aspartic proteinases during experimental infection of human epidermis. *J Invest Dermatol* **114**: 712-717.
- [372] Schaller M, Krnjaic N, Niewerth M, Hamm G, Hube B & Korting HC (2003) Effect of antimycotic agents on the activity of aspartyl proteinases secreted by *Candida albicans*. *J Med Microbiol* **52**: 247-249.
- [373] Schaller M, Hube B, Ollert MW, Schafer W, Borg-von Zepelin M, Thoma-Greber E & Korting HC (1999) In vivo expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. *J Invest Dermatol* **112**: 383-386.

- [374] Schaller M, Bein M, Korting HC, *et al.* (2003) The secreted aspartyl proteinases Sap1 and Sap2 cause tissue damage in an in vitro model of vaginal candidiasis based on reconstituted human vaginal epithelium. *Infect Immun* **71**: 3227-3234.
- [375] Schmitz G & Orso E (2002) CD14 signalling in lipid rafts: new ligands and co-receptors. *Curr Opin Lipidol* **13**: 513-521.
- [376] Schneider JJ, Unholzer A, Schaller M, Schafer-Korting M & Korting HC (2005) Human defensins. *J Mol Med* **83**: 587-595.
- [377] Segal E (2005) Candida, still number one--what do we know and where are we going from there? *Mycoses* **48 Suppl 1**: 3-11.
- [378] Sendid B, Tabouret M, Poirot JL, Mathieu D, Fruit J & Poulain D (1999) New enzyme immunoassays for sensitive detection of circulating Candida albicans mannan and antimannan antibodies: useful combined test for diagnosis of systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* **37**: 1510-1517.
- [379] Sendid B, Poirot JL, Tabouret M, Bonnin A, Caillot D, Camus D & Poulain D (2002) Combined detection of mannanaemia and antimannan antibodies as a strategy for the diagnosis of systemic infection caused by pathogenic Candida species. *J Med Microbiol* **51**: 433-442.
- [380] Sendid B, Caillot D, Baccouch-Humbert B, Klingspor L, Grandjean M, Bonnin A & Poulain D (2003) Contribution of the Platelia Candida-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic Candida tropicalis infection in neutropenic adults. *J Clin Microbiol* **41**: 4551-4558.
- [381] Sendid B, Jouault T, Coudriau R, Camus D, Odds F, Tabouret M & Poulain D (2004) Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of alpha- and beta-linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* **42**: 164-171.
- [382] Sergeeva MG, Gonchar MV, Mevkh AT & Varfolomeyev SD (1997) Prostaglandin E2 biphasic control of lymphocyte proliferation: inhibition by picomolar concentrations. *FEBS Lett* **418**: 235-238.
- [383] Sevilla MJ, Robledo B, Rementeria A, Moragues MD & Ponton J (2006) A fungicidal monoclonal antibody protects against murine invasive candidiasis. *Infect Immun* **74**: 3042-3045.
- [384] Shaw MH, Reimer T, Kim YG & Nunez G (2008) NOD-like receptors (NLRs): bona fide intracellular microbial sensors. *Curr Opin Immunol* **20**: 377-382.
- [385] Shepherd VL, Tarnowski BI & McLaughlin BJ (1991) Isolation and characterization of a mannose receptor from human pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **32**: 1779-1784.
- [386] Shibata N, Ichikawa T, Tojo M, Takahashi M, Ito N, Okubo Y & Suzuki S (1985) Immunochemical study on the mannans of Candida albicans NIH A-207, NIH B-792, and J-1012 strains prepared by fractional precipitation with cetyltrimethylammonium bromide. *Arch Biochem Biophys* **243**: 338-348.
- [387] Sivori S, Falco M, Della Chiesa M, Carlomagno S, Vitale M, Moretta L & Moretta A (2004) CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**: 10116-10121.
- [388] Skrzypek F, Cenci E, Pietrella D, Rachini A, Bistoni F & Vecchiarelli A (2009) Dectin-1 is required for human dendritic cells to initiate immune response to Candida albicans through Syk activation. *Microbes Infect* **11**: 661-670.
- [389] Slutsky B, Staebell M, Anderson J, Risen L, Pfaller M & Soll DR (1987) "White-opaque transition": a second high-frequency switching system in Candida albicans. *J Bacteriol* **169**: 189-197.

- [390] Smith GA, Marquis H, Jones S, Johnston NC, Portnoy DA & Goldfine H (1995) The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect Immun* **63**: 4231-4237.
- [391] Smits GJ, van den Ende H & Klis FM (2001) Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**: 781-794.
- [392] Soll DR (1992) High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* **5**: 183-203.
- [393] Soll DR (2004) Mating-type locus homozygosity, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*. *Bioessays* **26**: 10-20.
- [394] Soll DR, Lockhart SR & Zhao R (2003) Relationship between switching and mating in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* **2**: 390-397.
- [395] Sonesson A, Ringstad L, Nordahl EA, Malmsten M, Morgelin M & Schmidtchen A (2007) Antifungal activity of C3a and C3a-derived peptides against *Candida*. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 346-353.
- [396] Souza LJ, Shio MT, Molan NA, Machado MC & Jancar S (2007) Acute pancreatitis affects non-parenchymal liver cells by a mechanism dependent on platelet-activating factor. *Pancreatology* **7**: 67-73.
- [397] Standiford TJ, Kunkel SL, Rolfe MW, Evanoff HL, Allen RM & Strieter RM (1992) Regulation of human alveolar macrophage- and blood monocyte-derived interleukin-8 by prostaglandin E2 and dexamethasone. *Am J Respir Cell Mol Biol* **6**: 75-81.
- [398] Steele C, Rapaka RR, Metz A, *et al.* (2005) The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog* **1**: e42.
- [399] Steele C, Marrero L, Swain S, *et al.* (2003) Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med* **198**: 1677-1688.
- [400] Stehr F, Felk A, Gacser A, *et al.* (2004) Expression analysis of the *Candida albicans* lipase gene family during experimental infections and in patient samples. *FEMS Yeast Res* **4**: 401-408.
- [401] Steinshamn S & Waage A (1992) Tumor necrosis factor and interleukin-6 in *Candida albicans* infection in normal and granulocytopenic mice. *Infect Immun* **60**: 4003-4008.
- [402] Steinshamn S, Bemelmans MH, van Tits LJ, Bergh K, Buurman WA & Waage A (1996) TNF receptors in murine *Candida albicans* infection: evidence for an important role of TNF receptor p55 in antifungal defense. *J Immunol* **157**: 2155-2159.
- [403] Stuyt RJ, Netea MG, Verschueren I, Fantuzzi G, Dinarello CA, Van Der Meer JW & Kullberg BJ (2002) Role of interleukin-18 in host defense against disseminated *Candida albicans* infection. *Infect Immun* **70**: 3284-3286.
- [404] Sundstrom P (2002) Adhesion in *Candida* spp. *Cell Microbiol* **4**: 461-469.
- [405] Suram S, Brown GD, Ghosh M, *et al.* (2006) Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the beta-glucan receptor. *J Biol Chem* **281**: 5506-5514.
- [406] Suttmuller RP, den Brok MH, Kramer M, *et al.* (2006) Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* **116**: 485-494.
- [407] Suzuki K, Okawa Y, Suzuki S & Suzuki M (1987) Candidacidal effect of peritoneal exudate cells in mice administered with chitin or chitosan: the role of serine protease on the mechanism of oxygen-independent candidacidal effect. *Microbiol Immunol* **31**: 375-379.
- [408] Suzuki S (1995) [Immunochemical study on mannan, the antigenic polysaccharide of pathogenic yeasts in man of genus *Candida*]. *Yakugaku Zasshi* **115**: 280-294.
- [409] Suzuki S, Shibata, N., and Kobayashi, H. (1991) Immunochemistry of *Candida* Mannans. *In Fungal cell wall and immune response* 111-121.

- [410] Suzuki T, Nishibayashi S, Kuroiwa T, Kanbe T & Tanaka K (1982) Variance of ploidy in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **152**: 893-896.
- [411] Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, *et al.* (2002) *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* **46**: 503-512.
- [412] Takahashi K, Donovan MJ, Rogers RA & Ezekowitz RA (1998) Distribution of murine mannose receptor expression from early embryogenesis through to adulthood. *Cell Tissue Res* **292**: 311-323.
- [413] Takeda K & Akira S (2004) Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci* **34**: 73-82.
- [414] Tang N, Liu L, Kang K, *et al.* (2004) Inhibition of monocytic interleukin-12 production by *Candida albicans* via selective activation of ERK mitogen-activated protein kinase. *Infect Immun* **72**: 2513-2520.
- [415] Tang T, Rosenkranz A, Assmann KJ, *et al.* (1997) A role for Mac-1 (CD11b/CD18) in immune complex-stimulated neutrophil function in vivo: Mac-1 deficiency abrogates sustained Fc $\gamma$  receptor-dependent neutrophil adhesion and complement-dependent proteinuria in acute glomerulonephritis. *J Exp Med* **186**: 1853-1863.
- [416] Tardif F, Goulet JP, Zakrzewski A, Chauvin P & Rouabhia M (2004) Involvement of interleukin-18 in the inflammatory response against oropharyngeal candidiasis. *Med Sci Monit* **10**: BR239-249.
- [417] Tarnowski BI, Shepherd VL & McLaughlin BJ (1988) Expression of mannose receptors for pinocytosis and phagocytosis on rat retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **29**: 742-748.
- [418] Tavares D, Ferreira P & Arala-Chaves M (2000) Increased resistance to systemic candidiasis in athymic or interleukin-10-depleted mice. *J Infect Dis* **182**: 266-273.
- [419] Taylor PR, Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA & Gordon S (2004) The role of SIGNR1 and the beta-glucan receptor (dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. *J Immunol* **172**: 1157-1162.
- [420] Taylor PR, Reid DM, Heinsbroek SE, Brown GD, Gordon S & Wong SY (2005) Dectin-2 is predominantly myeloid restricted and exhibits unique activation-dependent expression on maturing inflammatory monocytes elicited in vivo. *Eur J Immunol* **35**: 2163-2174.
- [421] Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S & Wong SY (2002) The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages. *J Immunol* **169**: 3876-3882.
- [422] Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, *et al.* (2007) Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol* **8**: 31-38.
- [423] Tessarolli V, Gasparoto TH, Lima HR, *et al.* (2009) Absence of TLR2 influences survival of neutrophils after infection with *Candida albicans*. *Med Mycol* 1-12.
- [424] Thornton BP, Vetvicka V, Pitman M, Goldman RC & Ross GD (1996) Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol* **156**: 1235-1246.
- [425] Tokunaga M, Niimi M, Kusamichi M & Koike H (1990) Initial attachment of *Candida albicans* cells to buccal epithelial cells. Demonstration of ultrastructure with the rapid-freezing technique. *Mycopathologia* **111**: 61-68.
- [426] Torosantucci A, Chiani P & Cassone A (2000) Differential chemokine response of human monocytes to yeast and hyphal forms of *Candida albicans* and its relation to the beta-1,6 glucan of the fungal cell wall. *J Leukoc Biol* **68**: 923-932.

- [427] Torosantucci A, Chiani P, Quinti I, Ausiello CM, Mezzaroma I & Cassone A (1997) Responsiveness of human polymorphonuclear cells (PMNL) to stimulation by a mannoprotein fraction (MP-F2) of *Candida albicans*; enhanced production of IL-6 and tumour necrosis factor-alpha (TNF-alpha) by MP-F2-stimulated PMNL from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol* **107**: 451-457.
- [428] Torosantucci A, Romagnoli G, Chiani P, *et al.* (2004) *Candida albicans* yeast and germ tube forms interfere differently with human monocyte differentiation into dendritic cells: a novel dimorphism-dependent mechanism to escape the host's immune response. *Infect Immun* **72**: 833-843.
- [429] Torosantucci A, Bromuro C, Chiani P, *et al.* (2005) A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med* **202**: 597-606.
- [430] Torosantucci A, Chiani P, Bromuro C, *et al.* (2009) Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence. *PLoS One* **4**: e5392.
- [431] Tortorano AM, Caspani L, Rigoni AL, Biraghi E, Sicignano A & Viviani MA (2004) Candidosis in the intensive care unit: a 20-year survey. *J Hosp Infect* **57**: 8-13.
- [432] Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L & Grillot R (2006) Candidaemia in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* **27**: 359-366.
- [433] Tortorano AM, Peman J, Bernhardt H, *et al.* (2004) Epidemiology of candidaemia in Europe: results of 28-month European Confederation of Medical Mycology (ECMM) hospital-based surveillance study. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **23**: 317-322.
- [434] Tosh FD & Douglas LJ (1992) Characterization of a fucoside-binding adhesin of *Candida albicans*. *Infect Immun* **60**: 4734-4739.
- [435] Tran P, Ahmad R, Xu J, Ahmad A & Menezes J (2003) Host's innate immune response to fungal and bacterial agents in vitro: up-regulation of interleukin-15 gene expression resulting in enhanced natural killer cell activity. *Immunology* **109**: 263-270.
- [436] Triantafilou M & Triantafilou K (2005) The dynamics of LPS recognition: complex orchestration of multiple receptors. *J Endotoxin Res* **11**: 5-11.
- [437] Trinchieri G, Pflanz S & Kastelein RA (2003) The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* **19**: 641-644.
- [438] Trinel PA, Jouault T, Cutler JE & Poulain D (2002) Beta-1,2-mannosylation of *Candida albicans* mannoproteins and glycolipids differs with growth temperature and serotype. *Infect Immun* **70**: 5274-5278.
- [439] Trinel PA, Lepage G, Jouault T, Strecker G & Poulain D (1997) Definitive chemical evidence for the constitutive ability of *Candida albicans* serotype A strains to synthesize beta-1,2 linked oligomannosides containing up to 14 mannose residues. *FEBS Lett* **416**: 203-206.
- [440] Trinel PA, Borg-von-Zepelin M, Lepage G, Jouault T, Mackenzie D & Poulain D (1993) Isolation and preliminary characterization of the 14- to 18-kilodalton *Candida albicans* antigen as a phospholipomannan containing beta-1,2-linked oligomannosides. *Infect Immun* **61**: 4398-4405.
- [441] Trinel PA, Plancke Y, Gerold P, *et al.* (1999) The *Candida albicans* phospholipomannan is a family of glycolipids presenting phosphoinositolmannosides with long linear chains of beta-1,2-linked mannose residues. *J Biol Chem* **274**: 30520-30526.
- [442] Trinel PA, Maes E, Zanetta JP, *et al.* (2002) *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannose inositol phosphoceramide family. *J Biol Chem* **277**: 37260-37271.
- [443] Trinel PA, Delplace F, Maes E, *et al.* (2005) *Candida albicans* serotype B strains synthesize a serotype-specific phospholipomannan overexpressing a beta-1,2-linked mannotriose. *Mol Microbiol* **58**: 984-998.

- [444] Tsoni SV, Kerrigan AM, Marakalala MJ, *et al.* (2009) Complement C3 plays an essential role in the control of opportunistic fungal infections. *Infect Immun*.
- [445] Tsoni SV, Kerrigan AM, Marakalala MJ, *et al.* (2009) Complement C3 plays an essential role in the control of opportunistic fungal infections. *Infect Immun* **77**: 3679-3685.
- [446] Tsuboi R, Komatsuzaki H & Ogawa H (1996) Induction of an extracellular esterase from *Candida albicans* and some of its properties. *Infect Immun* **64**: 2936-2940.
- [447] Underhill DM (2007) Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. *Immunol Rev* **219**: 75-87.
- [448] Uppuluri P, Chaturvedi AK & Lopez-Ribot JL (2009) Design of a simple model of *Candida albicans* biofilms formed under conditions of flow: development, architecture, and drug resistance. *Mycopathologia* **168**: 101-109.
- [449] Uppuluri P, Pierce CG & Lopez-Ribot JL (2009) *Candida albicans* biofilm formation and its clinical consequences. *Future Microbiol* **4**: 1235-1237.
- [450] Urban C & Zychlinsky A (2007) Netting bacteria in sepsis. *Nat Med* **13**: 403-404.
- [451] Urban CF, Lourido S & Zychlinsky A (2006) How do microbes evade neutrophil killing? *Cell Microbiol* **8**: 1687-1696.
- [452] van Burik JA & Magee PT (2001) Aspects of fungal pathogenesis in humans. *Annu Rev Microbiol* **55**: 743-772.
- [453] van de Veerdonk FL, Joosten LA, Devesa I, *et al.* (2009) Bypassing pathogen-induced inflammasome activation for the regulation of interleukin-1beta production by the fungal pathogen *Candida albicans*. *J Infect Dis* **199**: 1087-1096.
- [454] van de Veerdonk FL, Marijnissen RJ, Kullberg BJ, *et al.* (2009) The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe* **5**: 329-340.
- [455] van der Graaf CA, Netea MG, Verschueren I, van der Meer JW & Kullberg BJ (2005) Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun* **73**: 7458-7464.
- [456] van der Graaf CA, Netea MG, Franke B, Girardin SE, van der Meer JW & Kullberg BJ (2006) Nucleotide oligomerization domain 2 (Nod2) is not involved in the pattern recognition of *Candida albicans*. *Clin Vaccine Immunol* **13**: 423-425.
- [457] Van der Graaf CA, Netea MG, Morre SA, Den Heijer M, Verweij PE, Van der Meer JW & Kullberg BJ (2006) Toll-like receptor 4 Asp299Gly/Thr399Ile polymorphisms are a risk factor for *Candida* bloodstream infection. *Eur Cytokine Netw* **17**: 29-34.
- [458] van der Waaij D (1984) The digestive tract in immunocompromised patients: importance of maintaining its resistance to colonization, especially in hospital in-patients and those taking antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek* **50**: 745-761.
- [459] van Enckevort FH, Netea MG, Hermus AR, Sweep CG, Meis JF, Van der Meer JW & Kullberg BJ (1999) Increased susceptibility to systemic candidiasis in interleukin-6 deficient mice. *Med Mycol* **37**: 419-426.
- [460] Vassiliou E, Jing H & Ganea D (2003) Prostaglandin E2 inhibits TNF production in murine bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol* **223**: 120-132.
- [461] Vazquez-Torres A & Balish E (1997) Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 170-192.
- [462] Vecchiarelli A, Puliti M, Torosantucci A, Cassone A & Bistoni F (1991) In vitro production of tumor necrosis factor by murine splenic macrophages stimulated with mannoprotein constituents of *Candida albicans* cell wall. *Cell Immunol* **134**: 65-76.
- [463] Vilanova M, Teixeira L, Caramalho I, *et al.* (2004) Protection against systemic candidiasis in mice immunized with secreted aspartic proteinase 2. *Immunology* **111**: 334-342.

- [464] Villamon E, Roig P, Gil ML & Gozalbo D (2005) Toll-like receptor 2 mediates prostaglandin E(2) production in murine peritoneal macrophages and splenocytes in response to *Candida albicans*. *Res Microbiol* **156**: 115-118.
- [465] Villamon E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Ferrandiz ML, Fradelizi D & Gil ML (2004) Toll-like receptor 2 is dispensable for acquired host immune resistance to *Candida albicans* in a murine model of disseminated candidiasis. *Microbes Infect* **6**: 542-548.
- [466] Viriyakosol S, Fierer J, Brown GD & Kirkland TN (2005) Innate immunity to the pathogenic fungus *Coccidioides posadasii* is dependent on Toll-like receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun* **73**: 1553-1560.
- [467] Vylkova S, Nayyar N, Li W & Edgerton M (2007) Human beta-defensins kill *Candida albicans* in an energy-dependent and salt-sensitive manner without causing membrane disruption. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 154-161.
- [468] Wadsworth E, Prasad SC & Calderone R (1993) Analysis of mannoproteins from blastoconidia and hyphae of *Candida albicans* with a common epitope recognized by anti-complement receptor type 2 antibodies. *Infect Immun* **61**: 4675-4681.
- [469] Wellington M, Dolan K & Krysan DJ (2009) Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes. *Infect Immun* **77**: 405-413.
- [470] Wells CA, Salvage-Jones JA, Li X, *et al.* (2008) The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. *J Immunol* **180**: 7404-7413.
- [471] Wenzel RP (1995) Nosocomial candidemia: risk factors and attributable mortality. *Clin Infect Dis* **20**: 1531-1534.
- [472] Werner H (1966) [Studies on the lipase activity in yeasts and yeast-like fungi]. *Zentralbl Bakteriolog Orig* **200**: 113-124.
- [473] Westhead EW & McLain G (1964) A Purification of Brewers' and Bakers' Yeast Enolase Yielding a Single Active Component. *J Biol Chem* **239**: 2464-2468.
- [474] Wheeler RT & Fink GR (2006) A drug-sensitive genetic network masks fungi from the immune system. *PLoS Pathog* **2**: e35.
- [475] Whitworth T, Popov VL, Yu XJ, Walker DH & Bouyer DH (2005) Expression of the *Rickettsia prowazekii* pld or tlyC gene in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediates phagosomal escape. *Infect Immun* **73**: 6668-6673.
- [476] Willment JA & Brown GD (2008) C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol* **16**: 27-32.
- [477] Wilson RB, Davis D & Mitchell AP (1999) Rapid hypothesis testing with *Candida albicans* through gene disruption with short homology regions. *J Bacteriol* **181**: 1868-1874.
- [478] Witkin SS, Kalo-Klein A, Galland L, Teich M & Ledger WJ (1991) Effect of *Candida albicans* plus histamine on prostaglandin E2 production by peripheral blood mononuclear cells from healthy women and women with recurrent candidal vaginitis. *J Infect Dis* **164**: 396-399.
- [479] Xia Y, Vetvicka V, Yan J, Hanikyrova M, Mayadas T & Ross GD (1999) The beta-glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *J Immunol* **162**: 2281-2290.
- [480] Yu L, Lee KK, Hodges RS, Paranchych W & Irvin RT (1994) Adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* to glycosphingolipid (Asialo-GM1) receptors is achieved by a conserved receptor-binding domain present on their adhesins. *Infect Immun* **62**: 5213-5219.
- [481] Yu L, Lee KK, Paranchych W, Hodges RS & Irvin RT (1996) Use of synthetic peptides to confirm that the *Pseudomonas aeruginosa* PAK pilus adhesin and the *Candida*

- albicans fimbrial adhesin possess a homologous receptor-binding domain. *Mol Microbiol* **19**: 1107-1116.
- [482] Yu L, Lee KK, Sheth HB, *et al.* (1994) Fimbria-mediated adherence of *Candida albicans* to glycosphingolipid receptors on human buccal epithelial cells. *Infect Immun* **62**: 2843-2848.
- [483] Zaugg C, Borg-Von Zepelin M, Reichard U, Sanglard D & Monod M (2001) Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. *Infect Immun* **69**: 405-412.
- [484] Zelante T, De Luca A, Bonifazi P, *et al.* (2007) IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance. *Eur J Immunol* **37**: 2695-2706.
- [485] Zhang MX & Kozel TR (1998) Mannan-specific immunoglobulin G antibodies in normal human serum accelerate binding of C3 to *Candida albicans* via the alternative complement pathway. *Infect Immun* **66**: 4845-4850.
- [486] Zhao X, Oh SH, Cheng G, *et al.* (2004) ALS3 and ALS8 represent a single locus that encodes a *Candida albicans* adhesin; functional comparisons between Als3p and Als1p. *Microbiology* **150**: 2415-2428.
- [487] Zheng X & Wang Y (2004) Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis. *Embo J* **23**: 1845-1856.

## **Les glycanes pariétaux de levures et leur implication dans l'induction et la régulation de la réponse immunitaire de l'hôte**

*Candida albicans* est une levure commensale du tube digestif humain mais aussi un opportuniste vrai. Il est à l'origine de candidoses superficielles et de candidoses profondes avec un taux de mortalité élevé (30 à 40% des cas). La transition saprophyte-pathogène s'opère à la suite d'une baisse des défenses immunitaires de l'hôte (locales ou générales), permettant la multiplication des levures.

Les travaux développés dans le laboratoire depuis les années 90, ont montré que les glycanes pariétaux des levures sont des stimuli pour la cellule macrophagique. Le but de ce travail a été de déterminer l'implication des glycanes présents dans la paroi des levures dans l'induction et la régulation de la réponse immune.

Le développement de la technique de cytométrie de flux appliquée aux levures, a permis d'examiner les glycanes pariétaux susceptibles d'interagir avec la cellule hôte au moment du contact avec les macrophages.

Les expériences de stimulation ont montré l'activité stimulatrice des levures vis-à-vis de cellules macrophagiques. Les résultats ont indiqué que, dépendant des récepteurs macrophagiques et des glycanes exprimés, différentes réponses cellulaires sont observées. Ainsi, *S. cerevisiae*, levure non pathogène, induit une réponse de type pro-inflammatoire. Des réponses cytokiniques opposées sont observées avec *C. albicans*. Cette balance entre réponse pro- et anti-inflammatoire dépend de la charge de levure interagissant avec les cellules macrophagiques. Les études portant sur la modulation de l'expression glycanique de surface lors de la phagocytose des levures par les macrophages indiquent que lorsque le ratio levure/macrophage est important, l'expression des  $\beta$ -1,2 oligomannosides est augmentée dans le phagosome, sans exposition des  $\beta$ -glucanes, conduisant à une réponse cellulaire de type anti-inflammatoire. Au contraire, quand la charge en levure est limitée, les  $\beta$ -glucanes sont exposés, conduisant à une réponse pro-inflammatoire.

Ainsi, ces résultats indiquent qu'en fonction des associations moléculaires et des ligands glycaniques, une réponse pro- ou anti-inflammatoire est élaborée. Les interactions entre les différents glycanes de la paroi de *C. albicans* et les récepteurs spécifiques des cellules macrophagiques sont critiques dans l'orientation de la réponse immune de l'hôte et donc dans la pathogénèse de la levure et l'infection.