

# Etude des marqueurs de virulence de *Trichophyton benhamiae* sur modèle d'infection cutanée murin optimisé

W. Poirier<sup>1</sup>, E. Faway<sup>2</sup>, C. Danzelle<sup>1</sup>, F. Maréchal<sup>1</sup>, Y. Tsuyoshi<sup>3</sup>, Y. Poumay<sup>2</sup>, B. Mignon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Fundamental and Applied Research for Animals & Health (FARAH), Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège (Belgium)

<sup>2</sup>Namur University ASBL (Belgium)

<sup>3</sup>Teikyo University Institute of Medical Mycology, Tokyo, Japan



Les dermatophytoses sont des mycoses cutanées superficielles de l'homme et l'animal causées par des champignons filamenteux appelés dermatophytes. Les dermatophytoses humaines sont très répandues et le plus souvent provoquées par des espèces appartenant au genre *Trichophyton*. L'émergence croissante de souches résistantes aux antifongiques actuels et l'absence de vaccins à usage humain soulignent la nécessité de développer de nouveaux traitements. Dans ce cadre, l'accroissement des connaissances relatives à la pathogénie des dermatophytoses, y compris la caractérisation des facteurs de virulence fongique sur modèle animal, constitue une étape clé pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques. Une méthode de standardisation de la production de spores de dermatophytes pour réaliser des inoculations *in vitro* et *in vivo* a récemment été publiée (Faway *et al.*, 2021). Si cette méthode basée sur l'utilisation de suspensions enrichies en spores unicellulaires permet le développement de l'infection sur épidermes humains reconstruits *in vitro*, elle n'est pas optimale pour la réalisation d'infections *in vivo* chez la souris.

L'objectif de cette étude consiste par conséquent à (1) analyser des gènes codant pour des facteurs de virulence supposés tels que les subtilisines, ainsi qu'à (2) produire et valider un inoculum standardisé permettant d'obtenir des infections cutanées exploitables sur modèle murin, avec la souche de référence *Trichophyton benhamiae* IHEM 20161.

## Bio-informatique

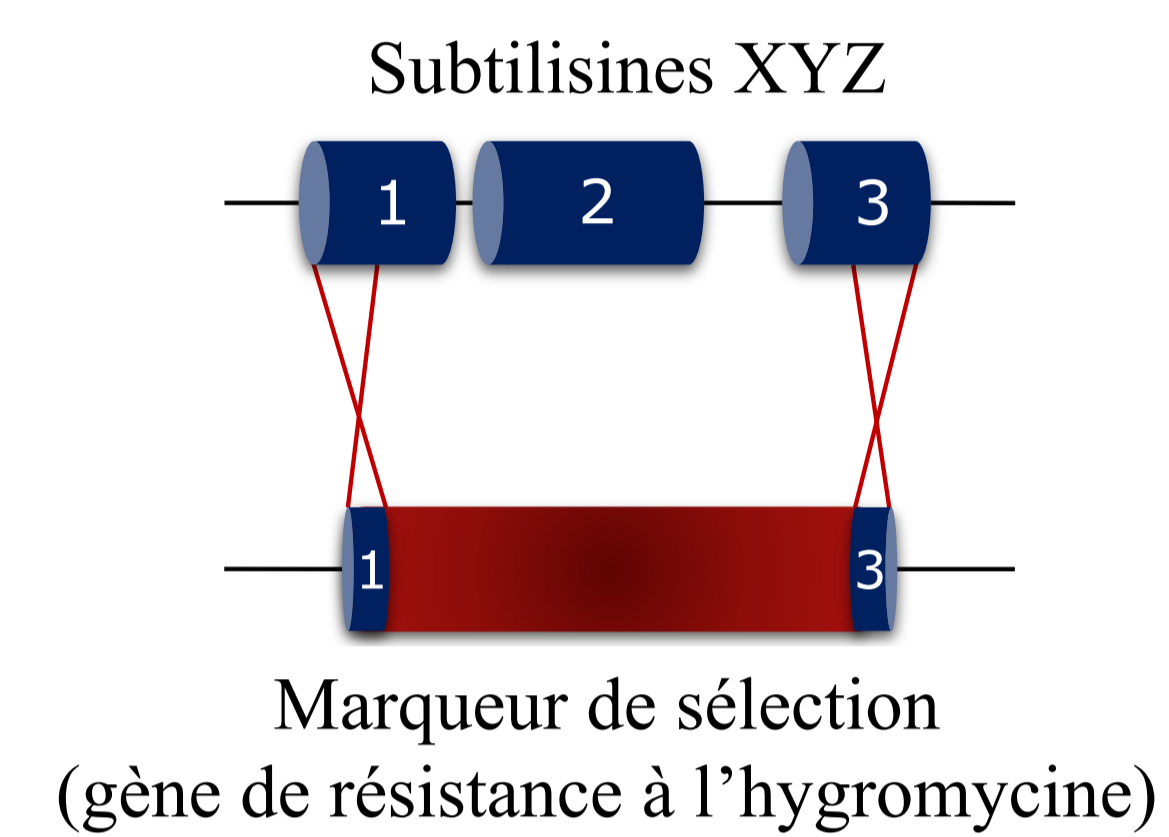
Tableau I : Liste des subtilisines retrouvées au sein du génome de *T. benhamiae* IHEM 20161.

Id. subtilisine	Id. gène	Nucléotides (pb)	Accession protéine	Acides aminés
Sub1	ARB_04944	1952	XP_003016653.1	612
Sub2	ARB_01495	1553	XP_003012235.1	424
Sub3	ARB_00701	1419	XP_003013156.1	397
Sub4	ARB_01032	1394	XP_003012781.1	407
Sub5	ARB_02223	1383	XP_003011669.1	396
Sub6	ARB_05307	1438	XP_003017013.1	412
Sub7	ARB_06076	1802	XP_003015765.1	504
Sub8	ARB_00777	1665	XP_003012895.1	490
Sub9	ARB_03790	1417	XP_003015507.1	402
Sub10	ARB_06467	1717	XP_003015344.1	500
Sub11	ARB_06111	1404	XP_003015799.1	400
Sub12	ARB_06416	1307	XP_003015293.1	416

- Méthode : Basic Local Alignment Search Tool (tBLASTn)
- Paramètres : homologie de séquence > 40% et E-value < 1.10<sup>-3</sup>
- WebSites : NCBI/EnsemblFungi/Augustus

## Mutagenèse

*T. benhamiae* IHEM 20161 ΔKu70



Mutants obtenus : ΔSub6 ; ΔSub7 ; ΔSub8 ; ΔSub10 ; ΔSub6.ΔSub10 ; ΔSub6.ΔSub8.ΔSub10

## Optimisation du modèle d'infection épicutanée

Spores / UFC\* (Faway *et al.*, 2021)

Tubes germinatifs / mycélium



\*Méthode d'infection classique

## Comparaison des infections

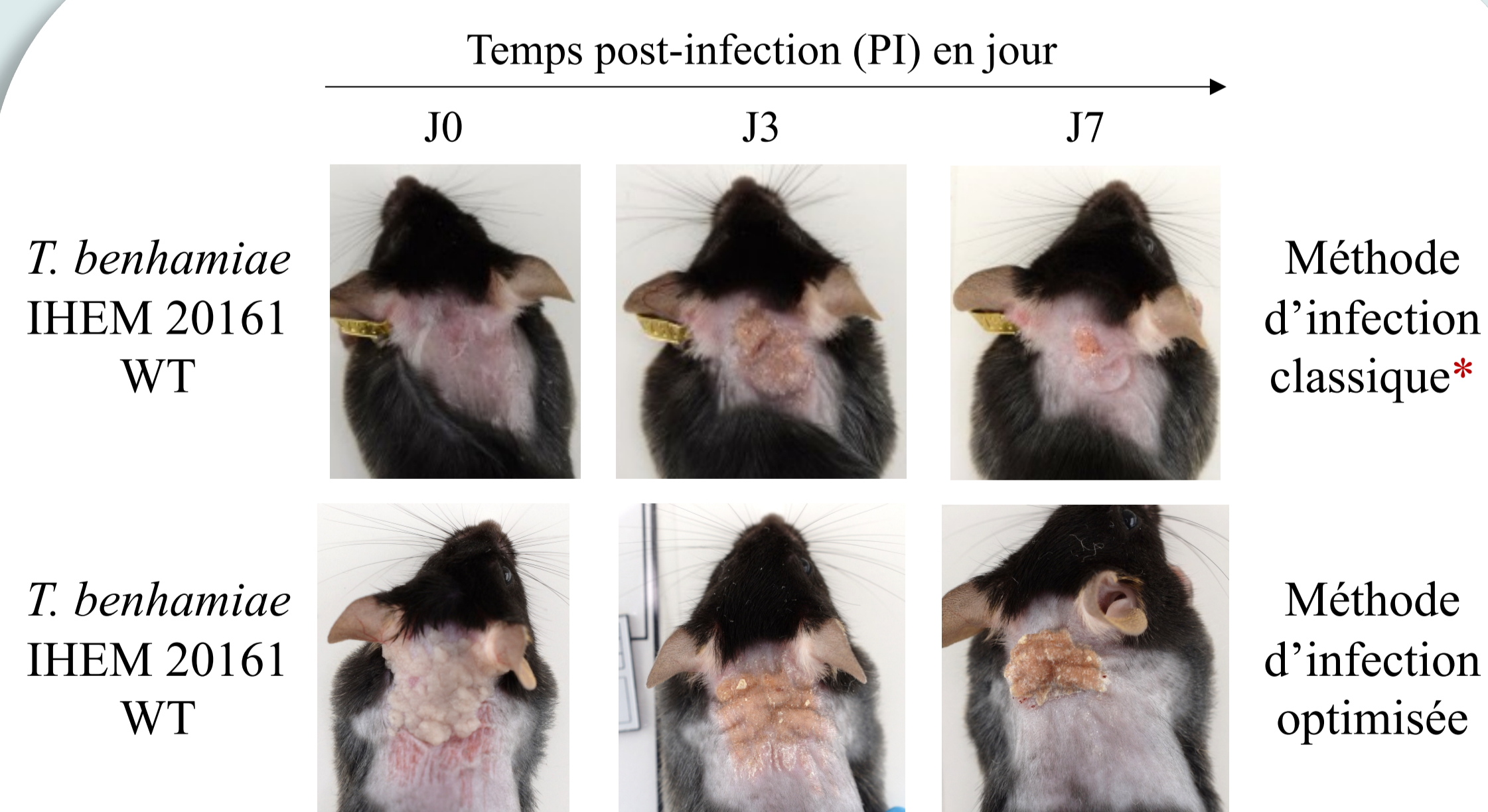


Fig. 1 : Comparaison des lésions cutanées en fonction de la méthode d'infection au cours du temps avec la souche *T. benhamiae*.

Comparativement à une infection classique (inoculum ne contenant que des spores), le nouveau modèle d'infection (mélange de spores/tubes germinatifs et mycélium) génère des lésions cutanées plus importantes et davantage persistantes.

## Score clinique

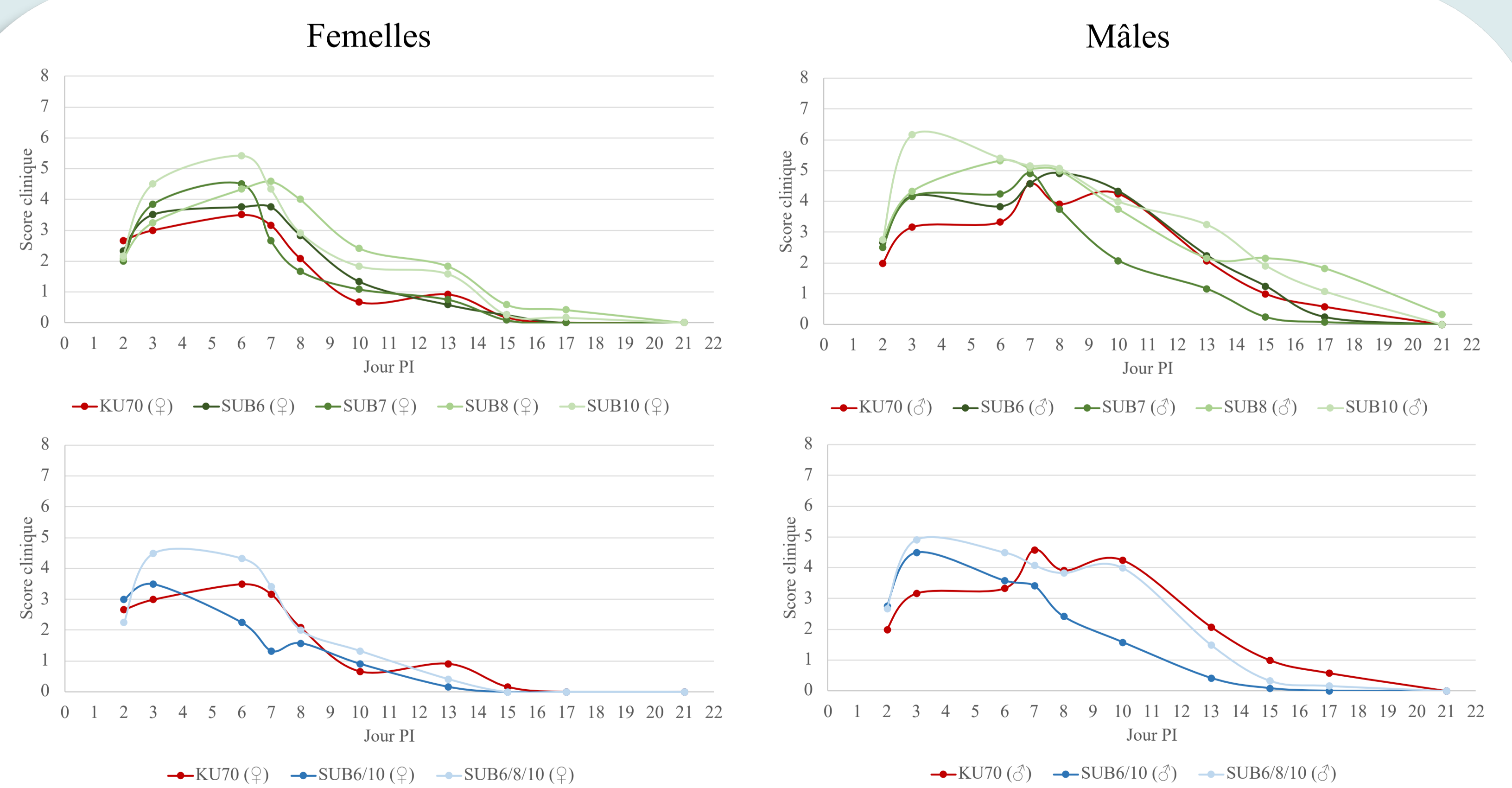


Fig. 2 : Suivi cinétique du score clinique des infections générées par les différentes souches mutées aux loci des subtilisines d'intérêt.

Des différences significatives existent entre mâles et femelles du 8<sup>ème</sup> au 15<sup>ème</sup> jour PI. Par conséquent, l'analyse des résultats doit tenir compte du sexe des souris. Les tendances de scores cliniques montrent pour chaque souche mutée des lésions cutanées plus intenses sur les temps précoces PI (de 3 à 6 jours), comparativement à la souche parente ΔKu70.

Le nouveau modèle d'infection épicutanée proposé ici mime une infection naturelle avec des lésions cliniques jusqu'au 21<sup>ème</sup> jour PI pour certaines souches mutées aux loci des subtilisines, contre des signes cliniques minimes jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour PI pour la méthode classique. De plus, l'analyse des résultats préliminaires de scores cliniques témoigne qu'une ou plusieurs subtilisines pourraient jouer un rôle dans la régulation et/ou le maintien de l'infection sur modèle murin. Prochainement, une deuxième expérience d'infection sur modèle murin consistera à réaliser des biopsies à des temps clés de l'infection pour (1) évaluer l'invasion des tissus cutanés par analyse histologique, (2) déterminer la charge fongique présente dans les tissus par quantification d'ADN génomique et (3) caractériser l'expression des subtilisines par PCR quantitative.