



UNIVERSITE DE LIEGE  
FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE  
DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES  
SERVICE DE PARASITOLOGIE ET DE PATHOLOGIE DES MALADIES PARASITAIRES

**Contribution à l'étude fonctionnelle des dipeptidyl peptidases et  
de la métalloprotéase MEP3 sécrétées par *Microsporium canis***

**Contribution to the functional study of dipeptidyl peptidases and  
MEP3 metalloprotease secreted by *Microsporium canis***

**Sandy VERMOUT**

THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE  
DOCTEUR EN SCIENCES VETERINAIRES, ORIENTATION MEDECINE  
VETERINAIRE

ANNEE ACADEMIQUE 2007-2008

*Au terme de ce travail, je tiens à remercier toutes les personnes qui, d'une façon ou d'une autre, m'ont soutenue au cours de ces années de doctorat.*

*Ma plus vive reconnaissance s'adresse à mon promoteur, le Docteur Bernard Mignon, qui m'a guidée tout au long de mon travail de thèse. Il s'est toujours montré très disponible pour résoudre les problèmes, tout en m'accordant une grande confiance et en me permettant d'être autonome. C'est en grande partie grâce à son dynamisme que j'ai pu mener à bien ce travail.*

*Je remercie également le Professeur Bertrand Losson, pour m'avoir permis de travailler au sein du service de Parasitologie et pour la profonde sympathie dont il a toujours fait preuve.*

*Le Docteur Frédéric Brouta et le Docteur Frédéric Descamps ont accompagné mes premiers pas dans la recherche scientifique et m'ont permis de me familiariser avec le travail de laboratoire. Ils m'ont écolée avec humour et enthousiasme, et je les en remercie vivement.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers Aline et Jérémy, tant pour leur amitié que pour leur collaboration scientifique au sein de notre équipe de recherche, ainsi qu'envers Françoise, Mireille, Vinciane, Catherine, Yannick, Céline, Maryse, Julien, Chantal, Caroline, Saadia, Régis, Jessica, et tous ceux qui au cours de ce doctorat ont été non seulement mes collègues de travail au quotidien, mais aussi des amis.*

*Merci également à Marie-Eve Dumez, Andy Chevigné, ainsi qu'aux Professeurs Moreno Galleni, Alain Vanderplasschen et Michel Monod, pour leurs conseils avisés et leur précieuse aide scientifique.*

*Ce travail n'aurait pu être réalisé sans le soutien financier du Fonds National de la Recherche Scientifique (F.N.R.S.), du Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et l'Agriculture (F.R.I.A.), et du Patrimoine de l'Université de Liège.*

*Enfin, si j'ai eu la chance de pouvoir concilier ce travail avec une vie familiale épanouie, c'est grâce à mon mari, Marc-Olivier, à mes parents, ainsi qu'à Marie-Jeanne et Pierre. Je les en remercie chaleureusement.*

# TABLE DES MATIERES

## AVANT-PROPOS

## ABREVIATIONS

## CHAPITRE 1 : INTRODUCTION..... 1

1. Introduction générale.....	1
2. <i>Microsporium canis</i> et la dermatophytose à <i>M. canis</i> .....	2
2.1. CLASSIFICATION.....	2
2.2. BIOLOGIE GENERALE.....	4
Ecologie.....	4
Morphologie et structure .....	6
2.3. EPIDEMIOLOGIE.....	10
2.4. ASPECTS CLINIQUES .....	11
2.5. DIAGNOSTIC.....	12
2.6. TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE.....	14
3. Pathogénèse des dermatophytoses.....	15
3.1. LES PROTEASES SECRETEES DES DERMATOPHYTES .....	16
3.1.1. Classification des protéases.....	17
Les protéases à sérine .....	17
Les métalloprotéases .....	18
Les dipeptidyl peptidases .....	18
3.1.2. Les protéases sécrétées des champignons pathogènes .....	20
3.1.3. Les protéases sécrétées par les dermatophytes et par <i>M. canis</i> .....	21
Caractéristiques moléculaires et enzymatiques .....	21
Rôles dans la dégradation des substrats kératinisés .....	23
Rôles dans la modulation de la réponse immune .....	24
Autres rôles.....	25
La sulphitolyse .....	25
Expression <i>in vivo</i> .....	26
3.2. ETABLISSEMENT DE L'INFECTION : ADHERENCE, GERMINATION, INVASION .....	26
3.3. FACTEURS IMMUNOMODULATEURS .....	27
4. Les mécanismes de défense de l'hôte vis-à-vis des dermatophytes.....	29
4.1. IMMUNITE INNEE.....	29
4.2. REACTION INFLAMMATOIRE .....	33
4.3. IMMUNITE SPECIFIQUE.....	34
Réponse cellulaire .....	34
Réponse humorale .....	36
Immunité spécifique anti- <i>M. canis</i> .....	37
5. La vaccination contre les dermatophytoses.....	38
5.1. VACCINS COMMERCIAUX.....	38
5.2. VACCINS EXPERIMENTAUX .....	39

## CHAPITRE 2 : OBJECTIF ET PLAN ..... 41

1. Objectif général .....	41
2. Plan .....	41
<b>CHAPITRE 3 : PRESENTATION SYSTEMATIQUE DES RECHERCHES .....</b>	<b>43</b>
ETUDE 1 : ESSAI DE VACCINATION DU COBAYE CONTRE LA DERMATOPHYTOSE A <i>M. CANIS</i> AU MOYEN D'UNE METALLOPROTEASE KERATINOLYTIQUE RECOMBINANTE DE 43,5 kDa (MEP3)	
<i>EVALUATION OF IMMUNOGENICITY AND PROTECTIVE EFFICACY OF A MICROSPORUM CANIS METALLOPROTEASE SUBUNIT VACCINE IN GUINEA PIGS....</i>	43
ETUDE 2 : ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES GENES DE DIPEPTIDYL PEPTIDASES DE <i>MICROSPORUM CANIS</i> ; ETUDE DE LEUR EXPRESSION <i>IN VIVO</i> ET <i>IN VITRO</i> . PRODUCTION DES PROTEASES SOUS FORME RECOMBINANTE ET ETUDE DE LA REPOSE IMMUNE CELLULAIRE CUTANEE ENVERS LA DIPEPTIDYL PEPTIDASE V DE <i>M. CANIS</i>	
<i>SECRETED DIPEPTIDYL PEPTIDASES AS POTENTIAL VIRULENCE FACTORS FOR MICROSPORUM CANIS.....</i>	59
ETUDE 3 : MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'INACTIVATION GENIQUE PAR L'ARN CHEZ <i>MICROSPORUM CANIS</i> . CONSTRUCTION DE SOUCHES DEFICIENTES AU NIVEAU DE LA DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV DE <i>M. CANIS</i> , ET DE SOUCHES DEFICIENTES AU NIVEAU D'UNE SUBTILASE KERATINOLYTIQUE DE 31,5 kDa (SUB3)	
RNA SILENCING IN THE DERMATOPHYTE <i>MICROSPORUM CANIS</i> .....	82
<b>CHAPITRE 4 : PRESENTATION SYNOPTIQUE DES RESULTATS ..</b>	<b>102</b>
1. ETUDE 1 .....	102
2. ETUDE 2.....	103
3. ETUDE 3.....	105
<b>CHAPITRE 5 : DISCUSSION GENERALE .....</b>	<b>106</b>
<b>CHAPITRE 6 : RESUME ET CONCLUSIONS.....</b>	<b>116</b>
<b>CHAPITRE 7 : BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>118</b>

# **AVANT-PROPOS**

Le travail est organisé de la manière suivante.

L'introduction et les objectifs font respectivement l'objet des chapitres 1 et 2.

Les recherches sont présentées de manière systématique dans le chapitre 3, sous la forme d'articles scientifiques originaux, rédigés en anglais, et qui sont publiés, sous presse, ou soumis pour publication. C'est par conséquent dans ce chapitre que le lecteur peut trouver l'ensemble des éléments relatifs à chacune des études, y compris le descriptif des matériels et méthodes. Les résultats d'une manipulation ultérieure sont présentés séparément en complément de l'étude 3, à la fin de celle-ci (page 101).

Les résultats de chacune de ces études sont résumés dans le chapitre 4.

Le chapitre 5 est consacré à la discussion générale des résultats obtenus tout au long de ce travail.

Le résumé et les conclusions sont exposés dans le chapitre 6.

Le chapitre 7 rassemble les références bibliographiques citées dans chacun des chapitres précédents.

## ABREVIATIONS

ALP	<i>alkaline protease</i> , protéase alcaline
AMI	<i>antibody-mediated immunity</i>
bp	<i>base pair</i> , paire de bases
CFU	<i>colony forming unit</i> , unité formant colonie
CLA	<i>cutaneous lymphocyte antigen</i>
CM	<i>collagen medium</i> , milieu à base de collagène
CMI	<i>cell-mediated immunity</i> , immunité à médiation cellulaire
cpm	<i>count per minute</i> , coup par minute
DPP	dipeptidyl peptidase
dsRNA	<i>double stranded RNA</i> , ARN double brin
DB	<i>digestion buffer</i> , tampon de digestion
Ds (DsRed)	<i>Discosoma stiatia</i>
DTH	<i>delayed-type hypersensitivity</i> , hypersensibilité de type retardé
DTM	<i>dermatophyte test medium</i>
DTT	dithiothréitol
EC	<i>enzyme commission</i>
FIV	<i>feline immunodeficiency virus</i> , virus de l'immunodéficience féline
FHM	<i>feline hair medium</i> , milieu à base de poils de chat
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GIGA	groupement interfacultaire de génomique appliquée
GLP	<i>glucagon-like peptide</i>
GM	<i>glucose medium</i> , milieu à base de glucose
GPI	glycosyl phosphatidyl inositol
GXM	glucuronoxylomannanes
hBD	<i>human <math>\beta</math>-defensin</i> , $\beta$ -défensine humaine
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i> , virus de l'immunodéficience humaine
HPH	<i>hygromycin B phosphotransferase</i>
HSP ou hsp	<i>heat shock protein</i> , protéine de choc thermique
IH	<i>immediate hypersensitivity</i> , hypersensibilité immédiate
IL	interleukine
IR	<i>inverted repeats</i> , répétitions inverses
kDa	kilodalton
KM	<i>keratin medium</i> , milieu à base de kératine
LAP	<i>leucine aminopeptidase</i>
LB	milieu de Luria-Bertani
LBT	<i>lymphocyte blastogenesis test</i> , test de transformation lymphoblastique
LC	<i>Langerhans cell</i> , cellule de Langerhans
LF	lethal factor ( <i>Bacillus anthracis</i> )
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MEP	métalloprotéase
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , complexe majeur d'histocompatibilité
MM	<i>minimal medium</i> , milieu minimal
MMP	<i>matrix metalloproteinases</i>
MR	<i>mannose receptor</i> , récepteur de mannose
MW	<i>molecular weight</i> , masse moléculaire
NO	<i>nitric oxide</i> , oxyde nitrique
NP	<i>neutral protease</i>

<i>o</i> -phénanthroline	<i>ortho</i> -phénanthroline
OD	<i>optical density</i> , densité optique
ODN	oligodéoxynucléotide
ORF	<i>open reading frame</i> , cadre de lecture ouvert
PAMP	<i>pathogen associated molecular pattern</i>
PAS	acide periodique de Schiff
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , tampon phosphate salin
PEG	polyéthylène glycol
PI	post-infection
PMN	polymorphonucléaire neutrophile
PMSF	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> , fluorure de phénylméthylsulfonyle
<i>p</i> Na	<i>para</i> -nitroanilide
POP	prolyl oligopeptidase
PRR	<i>PAMP recognition receptor</i>
r- ou r	recombinante
RfC	récepteur de fragments Fc
RMGS	<i>RNA-mediated gene silencing</i> , inactivation génique via l'ARN
RNAi	<i>RNA interference</i> , interférence à l'ARN
Sab	milieu de Sabouraud
Sap	<i>secreted aspartic protease</i> , protéase aspartique sécrétée
SAP	<i>schrump alkaline phosphatase</i>
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate – polyacrylamid gel electrophoresis</i> , électrophorèse en gel de polyacrylamide en présence de dodécyl sulfate de sodium
SI	<i>stimulation index</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i> , petit ARN interférant
Sorb	sorbitol
SUB	subtilase
STC	sorbitol tris calcium
Th	<i>T helper</i> , T auxiliaire
TLR	<i>Toll-like receptor</i> , récepteur de type Toll
TRM	<i>Trichophyton rubrum mannans</i> , mannanes de <i>T. rubrum</i>
vol	volume
wt/vol	<i>weight/volume</i> , poids/volume
w:v	<i>weight:volume</i> , poids:volume
YPDS	<i>yeast extract peptone dextrose medium</i>

# **Chapitre 1**

## **Introduction**



## **1. Introduction générale**

Les dermatophytoses sont des mycoses cutanées provoquées par des champignons filamenteux kératinophiles, les dermatophytes. Ces affections cosmopolites sont fréquemment rencontrées tant chez l'homme que chez l'animal. Dans le langage courant, on les appelle « teignes », et, en médecine humaine, elles sont souvent désignées par le nom latin *tinea*. Contrairement à la plupart des autres champignons pathogènes, les dermatophytes sont des parasites obligatoires infectant des individus en bonne santé, et les infections dont ils sont responsables sont contagieuses.

Le dermatophyte *Microsporum canis* a pour hôte naturel et réservoir le chat, chez qui il peut causer des infections chroniques aux lésions ténues ; c'est le plus souvent à partir du chat qu'il se transmet aux autres espèces animales ainsi qu'à l'homme. Il est aussi l'agent de dermatophytose le plus souvent isolé chez le chien. L'incidence des infections humaines par *M. canis* reste élevée dans les pays occidentaux, sans doute en raison de l'engouement croissant pour les animaux de compagnie. En plus du danger qu'elle représente en tant que zoonose, la dermatophytose féline constitue un problème considérable dans les collectivités de chats, où elle sévit à l'état endémique.

La pathogénèse des infections par *M. canis*, ainsi que des autres dermatophytoses, est encore loin d'être élucidée. Leur étonnante capacité de se nourrir à partir de la barrière protectrice que constitue l'épiderme, ainsi que les interactions particulières qui existent entre eux et le système immunitaire, sont déterminantes pour la pathogénicité des dermatophytes. Les mécanismes qui y président, et surtout leurs bases moléculaires, restent très mal compris.

Les protéases kératinolytiques sécrétées par les dermatophytes jouent plus que probablement un rôle clé dans l'établissement et l'évolution des dermatophytoses. Chez *M. canis* comme chez *Trichophyton rubrum*, un important agent de dermatophytose humaine, deux familles de gènes ont été isolées, codant respectivement pour des subtilases (SUB) et des métalloprotéases (MEP). Dans le cas de *M. canis*, deux d'entre elles en particulier, SUB3 et MEP3, sont considérées comme de potentiels facteurs de virulence. En effet, leur production est déclenchée lorsque le champignon est cultivé avec de la kératine comme unique source d'azote, elles sont hautement kératinolytiques, et elles sont exprimées *in vivo* en cours d'infection. L'investigation du rôle de ces kératinases doit évidemment être poursuivie ; toutefois, d'autres protéases sécrétées apparaissent comme potentiellement impliquées dans plusieurs aspects de la pathogénèse de l'infection. C'est le cas des dipeptidyl peptidases, qui ont été caractérisées au niveau moléculaire chez *T. rubrum* (Monod *et al.*, 2005).

L'expression clinique de l'infection par *M. canis* dépend aussi de la réponse immunitaire développée par l'hôte. En effet, les dermatophytes, dont *M. canis*, induisent une réponse immunitaire spécifique, mais qui semble varier en qualité et en intensité selon l'adaptation de chaque espèce fongique à son hôte et selon le statut physiopathologique de l'individu infecté. Les protéases fongiques sécrétées, à nouveau, pourraient participer à cette modulation de la réponse immunitaire.

Actuellement, si un certain nombre de vaccins anti-dermatophytes et anti-*M. canis* ont été évalués, et éventuellement commercialisés, aucun d'entre eux n'est parfaitement caractérisé, et aucun n'a fait la preuve de son efficacité. La connaissance des mécanismes immunitaires efficaces et protecteurs contre les dermatophytoses doit donc être améliorée, dans le but de mettre au point des vaccins sûrs et efficaces contre ces infections.

L'objectif général de ce travail est de contribuer à l'élucidation du rôle des protéases fongiques sécrétées dans la pathogenèse de l'infection par *M. canis*. L'une d'entre elles, MEP3, fera l'objet d'un essai vaccinal. D'autres protéases, les DPPIV et V, seront caractérisées au niveau moléculaire et soumises à une première évaluation de leur possible implication en tant que facteurs de virulence. Enfin, une technique d'inactivation génique post-transcriptionnelle destinée à l'investigation fonctionnelle des gènes chez *M. canis* sera mise au point en utilisant comme cibles les gènes codant pour SUB3 et DPPIV.

## **2. *Microsporium canis* et la dermatophytose à *M. canis***

### **2.1. CLASSIFICATION**

Les dermatophytes forment un groupe de champignons filamenteux ayant en commun des caractéristiques morphologiques (la production de micro- et de macroconidies *in vitro*) et physiologiques (l'utilisation de la kératine *in vitro*, et *in vivo* pour les espèces pathogènes).

Les champignons (filamenteux et levures) sont généralement classés selon les caractéristiques de leur reproduction sexuée, bien que leur identification en laboratoire s'effectue le plus souvent d'après la morphologie de leur forme asexuée. Chez les dermatophytes, la forme asexuée ou anamorphe est celle rencontrée dans les conditions courantes de culture ainsi que lors de la croissance *in vivo*; par contre, la forme sexuée ou téléomorphe ne s'obtient que dans des conditions culturales bien particulières. De plus, la forme téléomorphe de la plupart des dermatophytes n'a été découverte que tardivement, ou pour certains d'entre eux n'a pas encore été décrite. C'est pourquoi, dans la terminologie courante,

on évoque généralement leur forme asexuée.

Selon la classification de De Hoog (De Hoog *et al.*, 1989 ; Van Cutsem et Rochette, 1992), le règne des champignons est divisé en six embranchements ou phylums renfermant les formes fongiques téléomorphes. A ceux-ci s'ajoute un septième embranchement, celui des *Fungi Imperfecti* ou champignons mitosporiques, où sont rangées les formes anamorphes des champignons y compris celles auxquelles ne correspond aucune forme sexuée connue. Les dermatophytes ainsi que la majeure partie des champignons pathogènes pour l'homme et l'animal appartiennent à l'embranchement des Ascomycètes (*Ascomycota*), qui présentent un thalle régulièrement septé produisant des ascospores contenues dans un asque. A côté de la classe des *Ascomycetes*, on y distingue celle des *Endomycetes*, qui sont des levures ; les téléomorphes du genre *Candida* et le genre *Saccharomyces* en sont des représentants typiques. Les formes sexuées des dermatophytes appartiennent à la classe des *Ascomycetes*, à l'ordre des *Onygenales*, à la famille des *Arthrodermataceae* et au genre *Arthroderma* ; la forme téléomorphe de *M. canis* est *Arthroderma otae*. Les genres *Eurotium* et *Eimericella*, correspondant au genre anamorphe *Aspergillus*, appartiennent comme les dermatophytes à la classe des *Ascomycetes* ; ils sont classés dans l'ordre des *Eurotiales*, qui comprend aussi le genre *Neurospora*.

Les trois genres anamorphes de dermatophytes, auxquels on se réfère très généralement pour les désigner, sont les genres *Microsporium*, *Trichophyton* et *Epidermophyton*. Parmi les *Fungi Imperfecti*, ils appartiennent au sous-embranchement des *Deuteromycotina*, à la classe des *Hyphomycetes*, à l'ordre des *Moniliales* et à la famille des *Moniliaceae*. Les *Hyphomycetes* présentent une morphologie essentiellement filamenteuse et portent des éléments de reproduction, les conidies ou spores asexuées, qui ne sont pas contenus dans un fruit. Cette classe s'oppose à celle des *Blastomycetes*, qui comprend principalement des champignons de type levure, notamment les genres *Candida*, *Cryptococcus* et *Malassezia*. La famille des *Moniliaceae* est caractérisée par des hyphes hyalins, dépourvus de pigment. Elle regroupe en plus des dermatophytes les genres *Aspergillus*, *Coccidioïdes* et *Histoplasma*.

Le tableau 1 présente un aperçu simplifié de la place de *M. canis* et des autres dermatophytes au sein de la classification des champignons.

**Tableau 1 :** Place de *Microsporium canis* (*Arthroderma otae*) et des autres dermatophytes dans la classification simplifiée des champignons

	EMBRANCHEMENT	CLASSE	ORDRE	FAMILLE	EXEMPLES
TÉLÉOMORPHES	<i>Ascomycota</i>				
		<i>Ascomycetes</i>	<i>Onygenales</i>	<i>Arthrodermataceae</i>	<b><i>Arthroderma otae</i></b> autres dermatophytes
				<i>Onygenaceae</i>	<i>Ajellomyces</i> spp. (téléomorphes d' <i>Histoplasma</i> spp. et <i>Blastomyces</i> spp.)
			<i>Eurotiales</i>	<i>Trichocomaceae</i>	téléomorphes d' <i>Aspergillus</i> spp. et <i>Penicillium</i> spp. <i>Neurospora crassa</i> <i>Sporothrix schenkii</i>
		<i>Endomycetes</i>	<i>Ophiostomatales</i>		<i>Saccharomyces</i> spp.
			<i>Saccharomycetales</i>		téléomorphes de <i>Candida</i> spp. agents de mucormycoses
	<i>Zygomycota</i>				
	<i>Basidiomycota</i>		<i>Filobasidiales</i>		téléomorphe de <i>Cryptococcus neoformans</i>
			<i>Agaricales</i>		<i>Agaricus bisporus</i> (« champignon de Paris »)
ANAMORPHES	<i>Fungi Imperfecti</i>	<i>Hyphomycetes</i>	<i>Moniliales</i>	<i>Moniliaceae</i>	<b><i>Microsporium canis</i></b> , <i>Microsporium</i> spp., <i>Trichophyton</i> spp., <i>Epidermophyton</i> spp., <i>Aspergillus</i> spp., <i>Coccidioides</i> spp., <i>Paracoccidioides</i> spp., <i>Histoplasma</i> spp., <i>Blastomyces</i> spp.
				<i>Dematiaceae</i>	<i>Alternaria</i> spp.
		<i>Blastomycetes</i>			<i>Candida</i> spp., <i>Cryptococcus neoformans</i> , <i>Malassezia</i> spp.

## 2.2. BIOLOGIE GENERALE

### Ecologie

Les dermatophytes sont kératinophiles et kératinolytiques ; ils utilisent comme substrats naturels des structures kératinisées. Les espèces saprophytes se nourrissent de débris kératinisés éliminés dans l'environnement, tandis que les espèces parasites envahissent le *stratum corneum* de l'épiderme ainsi que les phanères (poils ou cheveux, griffes ou ongles). Les dermatophytes pathogènes restent généralement confinés à ces tissus, et n'atteignent que rarement les couches plus profondes de la peau et très exceptionnellement les organes internes.

On distingue trois groupes de dermatophytes selon leur habitat naturel, les dermatophytes anthropophiles, zoophiles, et géophiles. Les espèces anthropophiles sont des parasites obligatoires de l'homme ; ils se transmettent essentiellement par contagion interhumaine mais peuvent occasionnellement infecter l'animal. Les dermatophytes zoophiles ont pour réservoir une ou plusieurs espèces animales. Cependant, ils sont souvent isolés lors de dermatophytoses humaines, et certaines espèces comme *M. canis* et *Trichophyton verrucosum* infectent l'homme très facilement. Les dermatophytes géophiles ou telluriques sont quant à eux

des saprophytes vivant dans le sol. Toutefois, ils peuvent accidentellement être à l'origine d'une infection humaine ou animale, par exemple suite au contact entre une peau lésée et un sol contaminé.

Les dermatophytes géophiles représentent vraisemblablement la forme ancestrale des dermatophytes pathogènes. Leurs propriétés kératinophiles et kératinolytiques et leur association de fait avec les animaux vivant en contact avec le sol les auraient prédisposés à évoluer vers des formes pathogènes cutanées (Weitzmann et Summerbell, 1995) et à développer ensuite leur spécificité d'hôte.

Les dermatophytoses se rencontrent partout dans le monde, et la plupart des dermatophytes, y compris *M. canis*, sont cosmopolites. Cependant, la fréquence des espèces isolées varie selon les zones géographiques, et certaines restent localisées à des régions données. La répartition des espèces évolue de plus en plus en raison des migrations Nord-Sud ; on assiste notamment à l'émergence en Europe de nouvelles espèces anthropophiles en provenance d'Afrique, comme *Trichophyton violaceum*.

Les dermatophytes rencontrés en dermatologie médicale et vétérinaire diffèrent largement de par leur spectre d'hôtes et de par leur importance en tant qu'agents pathogènes. Chez les animaux domestiques, les espèces responsables de dermatophytoses appartiennent principalement aux genres *Microsporum* et *Trichophyton*. Un aperçu des principales espèces de dermatophytes est présenté dans le tableau 2.

**Tableau 2 :** Ecologie, zones d'endémie particulières et hôtes principaux des espèces de dermatophytes les plus fréquemment isolées. Les dermatophytes appartiennent aux genres *Microsporum* (*M.*), *Trichophyton* (*T.*) et *Epidermophyton* (*E.*).

Espèces anthropophiles	Zones d'endémie	Hôtes
<i>E. floccosum</i>		
<i>M. andouinii</i> (var. <i>langeronii</i> )	Afrique	
<i>M. ferrugineum</i>	Extrême-Orient, Europe de l'Est	
<i>T. rubrum</i>		
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>		
<i>T. tonsurans</i>	Amériques	
<i>T. violaceum</i>	Afrique du Nord, pourtour méditerranéen, Moyen-Orient	
<i>T. soudanense</i>	Afrique subsaharienne	
<i>T. concentricum</i>	Asie du Sud-Est et Océanie, Amazonie, Amérique centrale et Mexique	
<i>T. schoenleinii</i>	Afrique du Nord, Europe centrale	
<i>T. gourvilii</i>	Afrique centrale	
Espèces zoophiles		
<i>M. canis</i>		Chat, chien (homme, lapin, rongeurs, cheval)
<i>M. equinum</i>		Cheval
<i>M. persicolor</i>		Campagnol (autres rongeurs, chien)
<i>T. mentagrophytes</i> var. <i>mentagrophytes</i> / <i>Arthroderma benhamiae</i>		Rongeurs, lapin, hérisson (chien, chat, homme)
<i>T. verrucosum</i>		Bovins, ovins, dromadaire (homme)
<i>T. equinum</i>		Cheval
<i>T. gallinae</i>		Poule, dinde, canard (autres oiseaux)
<i>T. erinacei</i>	Nouvelle-Zélande	Hérisson (chien, chat, homme)
<i>T. quinckeanum</i>		Souris (autres rongeurs)
<i>T. sarkisovii</i>		Chameau
<i>T. simii</i>	Brésil, Etats-Unis, Japon	Singe, volaille (chien)
Espèces géophiles		
<i>M. cookei</i>		
<i>M. gypseum</i>		(chien, chat)
<i>M. fulvum</i>		
<i>M. praecox</i>		(cheval)
<i>M. boullardii</i>		
<i>T. ajelloi</i>		
<i>T. terrestre</i>		
<i>M. nanum</i>		(porc)

## Morphologie et structure

Comme la plupart des champignons filamenteux, les dermatophytes sont polymorphes. Ils revêtent une forme différente selon le milieu dans lequel ils poussent, et selon qu'ils vivent en culture, *in vitro*, ou à l'état parasitaire, *in vivo*.

En culture sur milieu de Sabouraud, constitué de glucose et de peptone, les colonies de *M. canis* ont un aspect macroscopique laineux ou duveteux, de couleur blanche au recto, et de

couleur généralement jaune orangée au verso (Figure 1). L'examen microscopique permet d'observer un mycélium septé ainsi que des macroconidies. Celles-ci sont en forme de quenouille, d'une longueur de 50 à 75  $\mu\text{m}$  environ ; elles présentent de sept à quatorze logettes, et ont une épaisse paroi garnie d'échinulations (Figure 2). La production de macroconidies sur milieu de Sabouraud est cependant tardive et inconstante ; par contre, la culture de *M. canis* sur certains milieux appauvris permet leur production en abondance. D'autres éléments peuvent être observés en fonction des souches fongiques et des conditions de culture ; il s'agit des microconidies, piriformes et implantées latéralement sur les hyphes, des chlamydozores sphériques et du « mycélium en raquette ». De nombreuses atypies se rencontrent chez *M. canis* au point de vue morphologique. Certaines souches sont par exemple non pigmentées, alors que d'autres, dites « dysgoniques », produisent des macroconidies déformées et peu nombreuses, ou n'en produisent pas, et ont un aspect macroscopique aberrant.

En s'adaptant au parasitisme, les dermatophytes pathogènes ont développé un mode de dissémination commun à toutes les espèces. Il s'agit de la fragmentation des filaments mycéliens en éléments infectants appelés arthrospores ou arthroconidies. Chez *M. canis*, les hyphes septés et les arthrospores qui en dérivent ont un diamètre de 2 à 4  $\mu\text{m}$ . L'arrangement de nombreuses spores de petite taille, polyédriques à sphériques, disposées en manchon autour du poil, et du mycélium disposé à l'intérieur du poil, est qualifié de parasitisme endo-ectothrix de type microsporique (Figure 3).

La structure de la paroi des dermatophytes n'est pas établie. Des études anciennes montrent qu'elle contient des glucanes, de la chitine, et en moindre quantité, des mannanes. Par analogie avec la paroi fongique d'*Aspergillus* spp., on peut supposer que celle des dermatophytes est constituée d'une épaisse couche de  $\beta$ -glucanes et de chitine lui donnant sa rigidité, et dans laquelle s'insèrent des polysaccharides amorphes, les galactomannanes et  $\alpha$ -glucanes. A la face inférieure de cette couche se trouveraient les protéines transmembranaires et à ancre GPI (*glycosyl phosphatidyl inositol*), tandis que les glycoprotéines de surface seraient liées à sa face externe.







### 2.3. EPIDEMIOLOGIE

Les dermatophytes zoophiles et anthropophiles se transmettent essentiellement par contact direct avec un animal ou une personne infectée, mais la contagion par contact indirect à partir d'un environnement souillé existe également (De Vroey, 1985). Les arthrospores éliminées dans le milieu extérieur avec les poils et squames des individus infectés sont particulièrement résistantes.

Les infections de type accidentel, par exemple celle de l'homme par un dermatophyte zoophile, sont rarement elles-mêmes à l'origine d'une contagion.

*Microsporium canis* est l'agent de dermatophytose le plus fréquent chez le chat et le chien. Dans ces espèces, il est respectivement responsable de plus de 90% et 80% des infections (Ackerman, 1998a, b ; Mancianti *et al.*, 2002 ; Mignon *et al.*, 2002). *Microsporium canis* a également été isolé, entre autres, chez le cheval, le lapin, le cobaye, le hamster, et des félins sauvages. Les autres cas de dermatophytoses des carnivores domestiques sont principalement dus à *Trichophyton mentagrophytes*, et dans une moindre mesure à *Microsporium gypseum*.

Le chat est considéré comme l'hôte naturel de *Microsporium canis*. L'isolement de ce dermatophyte à partir du pelage félin est très fréquent, et ce même en l'absence de lésions cliniques évidentes. Ce portage asymptomatique est en réalité le reflet de deux situations différentes (Mignon et Losson, 1997), à savoir un simple portage mécanique transitoire, ou une véritable infection active, auquel cas un examen dermatologique minutieux permet le plus souvent la mise en évidence de discrètes lésions. Les animaux infectés asymptomatiques jouent probablement un rôle épidémiologique majeur car ils disséminent dans l'environnement un grand nombre d'arthrospores infectantes ; par contre, le portage mécanique a sans doute très peu de conséquences en termes de transmission de l'infection et ne serait que le reflet de la contamination de l'environnement par des individus infectés de façon active (Mignon et Losson, 1997).

Comme celle des autres dermatophytes pathogènes, la transmission de *M. canis* s'effectue le plus souvent par contact direct. La transmission à partir de l'environnement est possible mais probablement moins efficace, puisque, malgré leur viabilité pouvant atteindre plusieurs années (Sparkes *et al.*, 1994 ; Ferreiro, 1995), le nombre de spores isolées dans l'environnement décroît rapidement lorsque l'animal source d'infection est retiré (Mignon et Losson, 1997).

*Microsporium canis* est l'agent zoophile le plus fréquemment isolé lors de dermatophytose humaine (Monod *et al.*, 2002b ; Borman *et al.*, 2007); en Belgique, comme

dans beaucoup d'autres régions du monde, une grande partie des cas de teigne du cuir chevelu sont causés par *M. canis* (Ahy *et al.*, 2000 ; Lateur, 2000 ; Arrese *et al.*, 2003). En Europe centrale et du Sud, et en particulier dans les pays méditerranéens, *M. canis* est plus souvent isolé que les importants agents anthropophiles que sont *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* var. *interdigitale* (Dolenc-Voljc, 2005 ; Borman *et al.*, 2007 ; Panasiti *et al.*, 2007). Cette prédominance est entretenue par l'important réservoir que représentent les populations incontrôlées de chats errants. Le plus souvent en effet, chez l'homme, les dermatophytoses à *M. canis* ont pour origine un contact direct voire indirect avec un chat infecté (Scott *et al.*, 2001 ; Romano, 1999 ; Maraki et Tselentis, 2000). L'homme peut toutefois être contaminé par d'autres espèces animales, comme le chien (Cafarchia *et al.*, 2006), et des contagions interhumaines, bien qu'exceptionnelles, ont été rapportées (Shah *et al.*, 1998 ; Snider *et al.*, 1993).

Le premier facteur favorisant lié aux dermatophytoses félines est, logiquement, la fréquence des contacts entre individus, qui augmente lors des rassemblements d'animaux. Les jeunes animaux sont plus souvent atteints (Mancianti *et al.*, 2002). Chez les chats à poils longs, le plus souvent de race Persan, l'isolement de *M. canis* à partir du pelage ainsi que l'infection active par le champignon sont nettement plus fréquents (Quaife et Womar, 1982 ; Sparkes *et al.*, 1993a ; Mancianti *et al.*, 2002 ; Brillhante *et al.*, 2003). Cette tendance s'explique certainement, en partie, par une moindre efficacité du toilettage. Toutefois, chez ces chats, l'infection tend en plus à être chronique et peu ou pas symptomatique (Mignon et Losson, 1997 ; Mignon *et al.*, 1999a ; Scott *et al.*, 2001), ce qui relève probablement d'un facteur génétique. Cette prédisposition concerne en effet certaines lignées de chats, comme l'a montré une étude épidémiologique menée par DeBoer et Moriello (1993) dans des chatteries où vivaient des animaux apparentés. En conséquence, la teigne dans les élevages de chats à poils longs prend souvent une ampleur considérable et est difficile à éradiquer.

L'association entre le portage de *M. canis* et l'infection par le virus de l'immunodéficience féline (FIV, *feline immunodeficiency virus*) à été observée par certains auteurs (Mancianti *et al.*, 1992), mais relève probablement du mode de vie des chats examinés plutôt que d'un lien de cause à effet (Sparkes *et al.*, 1994 ; Mignon et Losson, 1997 ; Mignon, 1998).

## **2.4. ASPECTS CLINIQUES**

De manière générale, même si des formes typiques sont décrites, les lésions de

dermatophytose sont extrêmement polymorphes et peuvent mimer toute une série d'autres affections cutanées (Scott *et al.*, 2001 ; Carlotti et Pin, 2002). La teigne féline à *M. canis* se présente le plus souvent sous forme de zones dépilées, sèches, squameuses, peu inflammatoires et bien délimitées ; les poils sont souvent cassés au ras de la peau, qui semble rasée. Les lésions peuvent être généralisées, ce qui est plus fréquent chez le chat que chez le chien. La localisation des lésions est variable, mais elles se situent le plus souvent au niveau de la tête, des oreilles, des membres antérieurs et de la queue (Figures 4, 5 et 6). Comme mentionné ci-dessus, de nombreux chats et en particulier des Persans présentent des lésions peu ou pas perceptibles, mais persistantes (Thomas *et al.*, 1989 ; Mignon et Losson, 1997). Cette forme de teigne est souvent découverte suite à l'infection d'autres animaux ou du propriétaire en contact. Des formes cliniques rares sont parfois rencontrées, comme par exemple la dermatite miliaire féline, syndrome caractérisé par du prurit et de multiples petites papules et croûtes disséminées sur le corps. Des onychomycoses et des otites externes à *M. canis* ont aussi été rapportées (Scott *et al.*, 2001). Le chat atteint peut également développer des kériens, lésions circonscrites très inflammatoires et suppurées. Ce type de lésions est cependant plus fréquent chez le chien.

Chez le chat Persan, *M. canis* peut dans de rares cas envahir le derme et l'hypoderme, alors qu'il reste normalement confiné à la couche cornée de l'épiderme. Il provoque alors des lésions caractéristiques appelées pseudomycétomes. Celles-ci sont décrites également chez l'homme et le chien, dans des cas d'immunodépression (Bond *et al.*, 2001 ; Abramo *et al.*, 2001 ; Zimmerman *et al.*, 2003 ; Berg *et al.*, 2007).

Chez l'homme adulte, *M. canis* provoque principalement des lésions de la peau glabre (*tinea corporis*), arrondies, érythémateuses et finement squameuses, appelées herpès circinés ou encore « roues de Sainte-Catherine » (Figure 5). Chez l'enfant, il est responsable de teignes tondantes du cuir chevelu (*tinea capitis*), ou de lésions circinées multiples et inflammatoires.

## **2.5. DIAGNOSTIC**

Le diagnostic final d'une teigne féline repose sur quatre examens complémentaires : l'examen du pelage à la lampe de Wood, l'examen microscopique direct, la culture fongique et l'examen histopathologique.

L'examen du pelage au moyen d'une lampe de Wood, qui émet une lumière ultraviolette d'une longueur d'onde de 365 nm, est un premier examen de choix. Les poils infectés par *M. canis* apparaissent verts fluorescents sous la lampe (Figure 7); cette fluorescence est due à la présence de ptéridine, produit de la métabolisation du tryptophane. Les squames ou les ongles

parasités ne deviennent par contre jamais fluorescents. Cependant, l'application de certains traitements topiques peut faire apparaître ou disparaître la fluorescence. Certains auteurs pensent que seule une fraction des souches de *M. canis* sont fluorescentes (Muller *et al.*, 1989 ; DeBoer et Moriello, 1995a), alors que selon d'autres, dont Mignon *et al.* (1998a), toutes les souches sont susceptibles de montrer une fluorescence à condition que l'examen soit correctement réalisé.

L'examen microscopique direct est réalisé sur des poils prélevés au sein d'une lésion ou fluorescents sous la lampe de Wood. Afin d'éclaircir la préparation, les poils sont examinés dans une solution de chloral lactophénol, ou d'hydroxyde de potassium 10%. Au grossissement 40X, les poils infectés apparaissent élargis, avec une surface irrégulière et abîmée. Aux grossissements supérieurs, des amas de spores sont observés autour du poil, et des filaments à l'intérieur du poil (Figure 3). Cet examen peut donc aboutir à un diagnostic de certitude, mais il dépend de la qualité du prélèvement et son interprétation peut s'avérer difficile pour le profane.

La culture fongique est l'examen de référence permettant un diagnostic définitif (Moriello, 2001). Elle permet en plus l'identification du dermatophyte isolé. Le matériel mis en culture peut être prélevé de différentes façons, par exemple au moyen d'une brosse à dents stérile. Le prélèvement est ensemencé sur un milieu contenant un antibiotique antibactérien et du cycloheximide, et incubé à 27°C. On utilise le plus souvent du milieu de Sabouraud, mais le milieu DTM (*Dermatophyte Test Medium*) (Guillot *et al.*, 2001) peut également être utilisé. Celui-ci contient du rouge phénol, qui vire au rouge lors de la croissance d'un dermatophyte ; ce système n'est toutefois pas infallible.

L'examen histopathologique est quant à lui rarement indispensable, et ne se justifie que dans certaines formes cliniques particulières de teigne, comme par exemple les pseudomycétomes. Les filaments et conidies sont visibles sur des coupes colorées à l'hématoxiline-éosine, mais des colorations plus spécifiques facilitent leur mise en évidence, comme la coloration à l'acide periodique de Schiff (PAS) ou celle de Gomori-Grocott. Les lésions observées à l'examen histopathologique ne sont pas caractéristiques (Muller *et al.*, 1989 ; Gross *et al.*, 1992 ; Scott *et al.*, 2001). L'inflammation peut être absente ou modérée, avec comme seul élément anormal une légère hyperkératose orthokératosique épidermique et folliculaire. Dans le cas contraire, on observe surtout une périfolliculite avec un infiltrat constitué majoritairement de lymphocytes et de macrophages, et plus rarement de polymorphonucléaires neutrophiles (PMN).

Depuis quelques années, une série de techniques moléculaires sont développées chez les dermatophytes, y compris *M. canis*, dans un but taxonomique ou diagnostique. Un kit basé

sur la PCR et l'hybridation, et destiné au diagnostic d'onychomycose dermatophytique, a été mis sur le marché en France (Savin *et al.*, 2007).

## 2.6. TRAITEMENT ET PROPHYLAXIE

Chez le chat à poil court, les dermatophytoses à *M. canis* peuvent guérir spontanément en quelques mois. Cependant, le traitement est requis dans la plupart des cas, pour des raisons éthiques et pour éviter la contagion. Chez le chat à poil long, la maladie peut par contre persister durant des années. Un protocole thérapeutique optimal associe un traitement antifongique local et systémique, et la décontamination de l'environnement (Moriello, 2004). La tonte partielle ou totale de l'animal peut être importante pour la réussite du traitement, surtout chez les animaux à poils longs et lors d'infections généralisées. Le traitement doit idéalement être accompagné d'un suivi sous forme de cultures fongiques effectuées régulièrement ; l'animal peut être considéré comme définitivement guéri après deux ou trois cultures négatives à une ou deux semaines d'intervalle (Moriello, 2004).

Le traitement topique doit être administré sous forme de bains afin d'imprégner toute la surface corporelle, et ne peut être rincé. Les principes actifs les plus efficaces sont le polysulfure de chaux (« bouillie soufrée »), le miconazole et l'énilconazole. En Europe, le plus souvent utilisé est l'énilconazole (Imavérol®) dilué à 2% et appliqué deux fois par semaine. Certains effets secondaires tels que de l'hypersalivation, de l'anorexie, des vomissements, ou encore une faiblesse musculaire, ont été rapportés, mais le médicament est globalement bien toléré (Hnilica et Medleau, 2002). Des shampooings vétérinaires à base de miconazole, ou associant miconazole et chlorhexidine (Mason *et al.*, 2000), ont montré leur efficacité contre la dermatophytose à *M. canis* ; aucun n'est toutefois disponible en Belgique. Un effet synergique semble exister entre le miconazole et la chlorhexidine, alors que la cette dernière n'a pas d'effet anti-fongique contre *M. canis*. La povidone iodine, un autre antiseptique, n'est pas plus efficace (Rycroft et McLay, 1991). Le traitement sous forme de bains est administré seul lorsque le coût du traitement systémique est prohibitif.

L'antifongique systémique de référence contre les dermatophyties a été pendant longtemps la griséofulvine, dont l'efficacité est largement prouvée. Il s'agit malheureusement d'un agent tératogène, car elle agit en empêchant la formation du fuseau mitotique ; de plus, elle peut provoquer divers effets secondaires. Elle n'est plus commercialisée en Belgique depuis 1999.

Comme pour le traitement local, les dérivés azolés sont les antifongiques les plus

utilisés par voie systémique. Ils inhibent la synthèse de l'ergostérol, un composant essentiel de la membrane cellulaire fongique. Le kétoconazole a été utilisé avec succès chez le chat ; toutefois, lui aussi peut avoir des effets tératogènes et secondaires. C'est un autre dérivé de ce type, l'itraconazole, qui est actuellement recommandé pour le traitement systémique des dermatophytoses des animaux de compagnie. Ce produit est très efficace et mieux toléré que le kétoconazole (Mancianti *et al.*, 1998). Dans une étude effectuée par Moriello et DeBoer (1995), il a permis de guérir des chats infectés en un temps plus court que la griséofulvine, et avec une excellente tolérance. Ses caractéristiques pharmacocinétiques et son affinité pour les tissus kératinisés ont été mis à profit pour développer des schémas thérapeutiques de type pulsé, par exemple à semaine alternée (Colombo *et al.*, 2001). Ces schémas présentent l'avantage de réduire le coût du traitement, par ailleurs très élevé. Actuellement, une solution d'itraconazole à administrer *per os* (Itrafungol®) est enregistrée en Belgique pour l'espèce féline.

La terbinafine (Lamisil®), une allylamine, agit également au niveau de la synthèse de l'ergostérol. Elle est très utilisée chez l'homme pour soigner les mycoses superficielles, et est particulièrement efficace dans le traitement des onyxis fongiques. Ce produit a fait l'objet de plusieurs études chez le chat et le chien (Chen, 2000 ; Mancianti *et al.*, 1999 ; Kotnik *et al.*, 2001) et pourrait constituer une alternative à l'utilisation des dérivés azolés.

Enfin, le lufénuron (Program®), un inhibiteur de la chitine synthase utilisé dans le cadre de la lutte contre les puces, a également fait l'objet d'études quant au traitement des dermatophytoses. Les résultats de ces études sont variables, et, malgré que ce principe actif semble avoir certains effets positifs (Ben Ziony et Arzi, 2000 ; Guillot *et al.*, 2002 ; DeBoer *et al.*, 2003), son utilité dans le cadre de la lutte contre la teigne à *M. canis* reste douteuse (Ben Ziony et Arzi, 2001 ; Moriello *et al.*, 2004 ; DeBoer *et al.*, 2004).

Les locaux et le matériel contaminés par des spores de *M. canis* doivent être soigneusement nettoyés et désinfectés. L'usage répété d'eau de Javel (hypochlorite de sodium) diluée au dixième, ou d'énilconazole en pulvérisation ou en fumigation (Clinafarm®), sont efficaces pour décontaminer l'environnement. Cette décontamination n'est pas toujours facile à mettre en oeuvre, mais est néanmoins cruciale pour l'éradication de la teigne dans les collectivités de chats.

### **3. Pathogenèse des dermatophytoses**

En raison de la localisation de l'infection au sein des tissus kératinisés, la majeure partie des recherches effectuées jusqu'à présent dans ce domaine concernent les protéases

potentiellement kératinolytiques. C'est ainsi qu'on a montré que les dermatophytes sécrètent tout un arsenal de protéases lorsqu'on les cultive sur un milieu contenant des protéines comme unique source d'azote. Les gènes de beaucoup d'entre elles ont été caractérisés, tout comme leur spécificité de substrat, et certaines se sont révélées être dotées d'un important pouvoir kératinolytique. Cependant, peu d'informations sont disponibles quant à la façon dont ces protéases coopèrent et dont leur expression est régulée pour digérer les structures kératinisées. Les autres rôles potentiels des protéases ont également été relativement peu investigués, tout comme les facteurs de virulence autres que les protéases.

### 3.1. LES PROTEASES SECRETEES DES DERMATOPHYTES

Les protéases, encore appelées peptidases ou enzymes protéolytiques, sont les enzymes qui catalysent le clivage des liaisons peptidiques au sein des protéines. Elles sont universelles et interviennent dans de multiples processus physiologiques, comme la digestion des nutriments, la maturation et l'inactivation d'hormones, le transport transmembranaire, etc.

En plus d'être associées au développement des tumeurs et de leurs métastases (Lee *et al.*, 2004 ; Rubin, 2005), les protéases jouent un rôle important dans la pathogenèse de très nombreuses infections et peuvent constituer de potentielles cibles thérapeutiques. Elles sont impliquées dans des processus très divers, tels que l'invasion tissulaire, l'inactivation de facteurs de défense de l'hôte, l'adhérence, la métamorphose, ou encore l'activation par clivage d'autres facteurs de virulence. Par exemple, les protéases à cystéine sécrétées par *Entamoeba histolytica* permettent l'établissement de l'infection en dissolvant le mucus protecteur de la paroi du colon, via la protéolyse de mucines (Lidell *et al.*, 2006 ; Moncada *et al.*, 2006) ; chez d'autres protozoaires parasites, comme ceux des genres *Leishmania* ou *Plasmodium*, des protéases sont impliquées dans plusieurs processus pathogéniques (Klemba et Goldberg, 2002). La colonisation et la dégradation du tissu périodontal par la bactérie *Porphyromonas gingivalis* relèvent d'une série de protéases différentes (Nakayama, 2003), dont font partie les gingipaines ; ces protéases à cystéine sont impliquées de plusieurs façons dans le pouvoir pathogène de la bactérie, y compris via la maturation de pro-protéases de l'hôte (Imamura *et al.*, 2003). La protéase à sérine membranaire CbpG de *Streptococcus pneumoniae* est quant à elle nécessaire à l'adhérence aux tissus hôtes (Mann *et al.*, 2006). Dans le monde des virus, la protéase aspartique du virus HIV (*human immunodeficiency virus*) constitue un maillon essentiel du cycle réplcatif viral en clivant des polyprotéines précurseurs, ce qui a fait d'elle une cible pour des médicaments antirétroviraux à base d'inhibiteurs (Brik et Wong, 2003). Il va



de soi que ce ne sont là que quelques exemples, et que les protéases sont des outils importants dans de très nombreux processus infectieux.

### 3.1.1. Classification des protéases

Dans la nomenclature internationale officielle des enzymes, les protéases représentent la catégorie EC 3.4 (EC pour *Enzyme Commission*) où le « 3 » fait référence aux hydrolases et le « 4 » aux peptidases. Selon la classification de référence, disponible dans la base de données électronique MEROPS (Rawlings *et al.*, 2006), les protéases sont réparties en 6 groupes selon la structure de leur site actif et le mécanisme catalytique qui en découle. C'est ainsi qu'on reconnaît les protéases acides ou aspartiques, les métalloprotéases, les protéases à sérine, les protéases à cystéine, les protéases à thréonine et les protéases glutamiques, en plus de celles dont le mécanisme catalytique est inconnu. Elles sont ensuite groupées en familles, qui rassemblent des protéases homologues entre elles. En fonction de leurs relations phylogénétiques, les familles peuvent être divisées en sous-familles, ou encore groupées en clans. Les groupes catalytiques et les clans sont chacun désignés par une lettre majuscule, les familles par un chiffre, les sous-familles par une autre lettre majuscule. Par exemple, la sous-famille M28E parmi les métalloprotéases appartient à la famille M28 et au clan MH ; la famille S10 de protéases à sérine appartient au clan SC mais n'est pas subdivisée en sous-familles. Les clans P regroupent des protéases de différents types catalytiques. Le tableau 3 (*cf. infra*) donne une vue d'ensemble de la classification des protéases, assortie de différents exemples.

Parallèlement, les protéases sont divisées en endoprotéases (EC 3.4.21-25) et exoprotéases (EC 3.4.11-19). Les premières clivent des liaisons peptidiques au sein de la séquence protéique, tandis que les secondes agissent à l'extrémité N- ou C-terminale des protéines, libérant un ou un petit nombre d'acides aminés.

#### Les protéases à sérine

Les membres de ce groupe présentent un site actif déterminé par trois résidus, comprenant en plus de la sérine, un aspartate et une histidine. Le motif conservé GX<sub>2</sub>SXG comprenant la sérine active caractérise la plupart de ces protéases.

Les endoprotéases à sérine (EC 3.4.21) contiennent de nombreuses protéases de mammifères, comme la chymotrypsine, la trypsine, la thrombine, l'élastase pancréatique, ou encore les granzymes des cellules cytotoxiques. Celles-ci appartiennent à la famille S1, l'une

des deux plus importantes parmi les protéases à sérine. La seconde est la famille S8, formée en majorité par les endoprotéases à sérine de type subtilisine (*subtilisin-like*) ou subtilases, et que certains auteurs considèrent comme un clan constitué de 6 familles (Siezen et Leunissen, 1997). Parmi elles, les subtilisines proprement dites, produites par des bactéries du genre *Bacillus*, sont les plus anciennes à avoir été caractérisées. Certaines d'entre elles, et notamment leur représentant-type, la subtilisine Carlsberg de *Bacillus licheniformis* (EC 3.4.21.62), entrent dans la formulation des détergents industriels. Des protéases provenant de toute une série d'autres bactéries et d'organismes eucaryotes se retrouvent toutefois dans cette famille. Chez les bactéries et champignons, beaucoup de subtilases sont des enzymes extracellulaires impliqués dans des fonctions de nutrition ou dans la défense vis-à-vis de facteurs d'environnement. Par exemple, la peptidase C5a des streptocoques pathogènes clive le composant C5a du complément, lui faisant perdre sa fonction de chémokine (Cleary *et al.*, 2004). Des peptidases de la famille S8 produites par *Dichelobacter nodosus* interviennent également dans la pathogenèse du piétain chez le mouton (Kortt et Stewart, 2004). La majorité des subtilases sont synthétisées sous forme de préproenzymes, qui sont libérés dans le milieu extérieur suite au clivage de leur peptide signal et activés par celui de leur propeptide. En général, les subtilases ne possèdent pas de ponts disulfures.

### **Les métalloprotéases**

L'activité protéolytique de ces enzymes dépend d'un ion métallique, souvent le zinc. L'ion zinc en question est lié à deux résidus histidine au sein du motif conservé HEXXH, ainsi qu'à un résidu glutamate (HEXXH + E). On retrouve notamment parmi les métalloprotéases à zinc le facteur LF (*lethal factor*) de *Bacillus anthracis*, qui clive des enzymes de la famille des MAPK kinases (*mitogen activated protein kinases kinases*), impliquées dans la transduction de nombreux signaux générés par la stimulation de récepteurs extracellulaires (Agrawal et Pulendran, 2004). Les neurotoxines de *Clostridium tetani* et *Clostridium botulinum* en font elles aussi partie, et agissent sur des protéines associées aux vésicules synaptiques et impliquées dans la neurotransmission (Hase et Finkelstein, 1993).

### **Les dipeptidyl peptidases**

Les dipeptidyl peptidases (DPP ; EC 3.4.14) libèrent des dipeptides spécifiques à l'extrémité N-terminale des protéines. Selon leur spécificité enzymatique et leur localisation

cellulaire, elles sont rangées dans des classes, au nombre de 10 actuellement, et désignées par un chiffre romain ou arabe (par exemple, DPP I, DPP10). On les retrouve chez tous les types d'organismes. Même si elles relèvent de différents groupes catalytiques, la majeure partie des DPP caractérisées sont des exoprotéases à sérine appartenant à la famille S9. Cette famille est caractérisée notamment par l'ordre dans lequel sont placés les résidus de la triade catalytique, Ser - Asp - His, au lieu de Asp - His - Ser pour la famille S8 et His - Asp - Ser pour la famille S1. Ce site actif est situé dans la portion C-terminale de la protéine. La division de la famille S9 en quatre sous-familles se base sur le motif séquentiel entourant la sérine du site actif, par exemple GWSYGGY pour la sous-famille S9B. Les protéases des sous-familles S9A et S9B sont largement représentées, tant chez les animaux que chez les microorganismes. Ce sont pour la plupart des prolyl oligopeptidases (POP), qui clivent les liens peptidiques de type proline-X, et libèrent un dipeptide voire un tripeptide. Cette capacité spécifique de cliver un lien peptidique impliquant un résidu proline est particulière parmi les protéases, étant donné la résistance à la protéolyse des liaisons impliquant ce résidu cyclique. Les prolyl dipeptidyl peptidases sont aussi qualifiées de protéases *DPPIV-like*, la désignation DPPIV étant normalement réservée aux membres de la sous-famille S9B. Certains membres de la famille S9 possèdent une activité endoprotéolytique ; cette caractéristique est toutefois inhabituelle étant donné l'encombrement stérique exercé par leur domaine N-terminal. D'autres POP se retrouvent au sein de la famille S15, dont notamment les protéines PepX des lactocoques et streptocoques ; leur site actif est cette fois situé dans la région N-terminale de la protéine. Les familles S9 et S15 appartiennent au même clan, le clan SC (Tableau 3).

Les DPP microbiennes peuvent être localisées dans différents compartiments cellulaires ou être exposées en surface. Même si des POP cytoplasmiques de la famille S15 ont été isolées à partir de surnageants de culture de la bactérie pathogène opportuniste *Streptococcus gordonii*, ces protéases ne possèdent pas de séquence signal et sont avant tout cytoplasmiques (Goldstein *et al.*, 2001). Les autres DPP connues et véritablement sécrétées proviennent toutes, à notre connaissance, de champignons filamenteux, et sont soit des DPPIV, soit des DPPV ou alanyl dipeptidyl peptidases. Les champignons de ce type semblent posséder deux prolyl dipeptidyl peptidases, l'une sécrétée et l'autre transmembranaire intracellulaire, intervenant probablement dans la maturation d'autres protéines. Cependant, la DPPIV sécrétée est totalement absente chez *Aspergillus niger* et *Neurospora crassa* (Jalving *et al.*, 2005). La DPPV sécrétée n'a quant à elle pas d'équivalent intracellulaire connu.

Chez les mammifères, des DPP de toutes les classes remplissent de multiples fonctions physiologiques. Par exemple, la DPPI ou cathepsine C est une protéase à cystéine qui active par

clivage des granzymes contenus dans les granules des cellules de l'immunité. La DPPIII est une métalloprotéase mais clive également les liens Pro-X ; elle intervient dans l'hydrolyse de peptides biologiques comme les endorphines et l'angiotensine. La DPP6 ou « DPPX » fait partie de la famille S9, mais curieusement, a perdu son activité enzymatique suite au remplacement de sa sérine catalytique par un résidu aspartate ; elle participe au transport transmembranaire au niveau des neurones. Cependant, la DPP mammalienne la plus importante est sans conteste la DPPIV ou récepteur CD26 (EC 3.4.14.5), le représentant type de la famille S9B, qui a été et est toujours extensivement étudiée. Elle remplit des fonctions variées dans divers processus biologiques, et ce sous forme sécrétée ou associée à la surface cellulaire ; elle est à la fois un facteur d'adhérence, une molécule de costimulation, et une enzyme activant ou inactivant par clivage des peptides bioactifs (pour revue : Boonacker et Van Noorden, 2003). L'activité liée à la DPPIV est augmentée ou diminuée dans toute une série d'états pathologiques, ce qui fait d'elle une cible thérapeutique à plusieurs niveaux (Lambeir *et al.*, 2003). Notamment, l'inhibition de l'inactivation du *glucagon-like peptide-1* (GLP-1) et d'hormones apparentées par cette protéase est mise à profit pour le développement de nouveaux traitements pour le diabète de type II, actuellement sur le point d'être commercialisés (von Geldern et Truvillyan, 2006). La DPPIV est aussi impliquée de diverses manières, à la fois positivement et négativement, dans l'infection par le virus HIV (Ohtsuki *et al.*, 2000), ainsi que dans le développement et le comportement de tumeurs et dans la pathogenèse de maladies auto-immunes (Thompson *et al.*, 2007).

### 3.1.2. Les protéases sécrétées des champignons pathogènes

C'est chez *Candida* et *Aspergillus* spp. que les protéases ont été le plus étudiées. De façon générale, l'intensité de la virulence de différentes souches d'*A. fumigatus* et de *C. albicans* a été corrélée avec leur activité protéolytique (Kothary *et al.*, 1984 ; Louie *et al.*, 1994).

*Aspergillus fumigatus* sécrète différentes classes de protéases (Monod *et al.*, 2002a), dont une protéase à sérine (ALP, pour *alkaline protease*) et une métalloprotéase (MEP), qui ont été proposées comme intervenant dans la pathogenèse de l'aspergillose pulmonaire invasive (Jaton-Ogay *et al.*, 1992; Monod *et al.*, 1993a). Ces deux protéases sont capables de digérer *in vitro* le collagène et l'élastine, composants majeurs du tissu pulmonaire, et sont responsables de la quasi-totalité de l'activité protéolytique du champignon à pH alcalin. Cependant, aucune des deux n'est un facteur de virulence essentiel, puisque des mutants de délétion, simples ou

doubles, ne présentent pas de perte de virulence (Monod *et al.*, 1993b ; Jatou-Ogay *et al.*, 1994 ; Smith *et al.*, 1994). Contrairement aux protéases homologues chez les dermatophytes (*cf. infra*), elles ne font pas partie de familles de gènes. Une protéine homologue à ALP, ALP2, a été identifiée ; elle semble ne pas être sécrétée, mais est un allergène important dans le cadre de certaines bronchites asthmatiques (Reichard *et al.*, 2000). Les exoprotéases sécrétées par *A. fumigatus* comprennent deux DPP, les DPPIV et V, deux leucine aminopeptidases, LAP1 et LAP2, et des carboxypeptidases. Deux classes de protéases sécrétées actives à pH acide ont également été mises à jour chez *A. fumigatus* ; il s'agit d'une famille de protéases à sérine de type sédolytines (famille S53), comprenant une endoprotéase et trois tripeptidyl peptidases, et d'une protéase aspartique, l'aspergillopepsine (Reichard *et al.*, 2002 ; 2006) ; la perte de cette dernière ne semble pas non plus avoir d'effets sur la virulence du champignon.

Chez la levure *C. albicans*, des protéases aspartiques sécrétées encodées par une famille de dix gènes (Saps, *secreted aspartic proteases*), ont été caractérisées (Schaller *et al.*, 1999), et sont des éléments clés dans la virulence du champignon (Naglik *et al.*, 2004). Des études utilisant différents modèles d'infection *in vitro* et *in vivo* ont en effet montré qu'elles étaient l'objet d'une régulation différentielle, et que les Saps 1 à 3 sont nécessaires lors de l'adhérence et de la colonisation initiale des muqueuses et de la peau, alors que les Saps 4 à 6 sont associées à la formation d'hyphes et contribuent à l'infection systémique. En outre, Sap2 est capable de cliver de nombreuses protéines associées aux défenses immunes, comme les IgA, l'Il-1 $\beta$ , l' $\alpha$ 2-macroglobuline, ou encore des composants du complément (Kaminishi *et al.*, 1995 ; Beausejour *et al.*, 1998).

### **3.1.3. Les protéases sécrétées par les dermatophytes et par *M. canis***

#### **Caractéristiques moléculaires et enzymatiques**

Une famille de gènes codant pour 5 métalloprotéases (MEP1 à MEP5) de la famille M36 (famille des fungalysines) a été isolée chez *M. canis*, *T. rubrum* et *T. mentagrophytes* (Brouta *et al.*, 2002 ; Jousson *et al.*, 2004a). Ces gènes sont homologues aux gènes uniques codant pour la MEP d'*A. fumigatus* et la NPI (*neutral protease I*) d'*Aspergillus oryzae*. De même, une famille de 7 gènes de subtilases de la famille S8 de sérine protéases a été isolée chez *T. rubrum*, ainsi que 3 de ses membres chez *M. canis* (Descamps *et al.*, 2002 ; Jousson *et al.*, 2004b). Les produits de ces gènes sont les homologues de la protéase ALP d'*A. fumigatus*.

Comme démontré par des tests d'inhibition par la *o*-phénanthroline et le PMSF (fluorure

de phénylméthylsulfonyle), des agents inhibant respectivement les métalloprotéases et les subtilases, ces deux familles de protéases génèrent chacune environ la moitié de l'activité protéolytique produite par les dermatophytes sur un milieu à base de protéines de soja et mesurée à l'aide de caséine marquée à la résorufine (Jousson *et al.*, 2004a). Cette observation met en évidence la symétrie existant entre les dermatophytes et *A. fumigatus* à ce niveau, et la possible spécialisation des dermatophytes.

Chez *M. canis*, MEP3 (43,5 kDa) et SUB3 (31,5 kDa) sont sécrétées de façon majoritaire sur un milieu à base de poils de chats; elles sont toutes deux hautement kératinolytiques, MEP3 étant également élastinolytique et collagénolytique (Mignon *et al.*, 1999a ; Brouta *et al.*, 2001). Chez *T. rubrum*, SUB3 et SUB4 sont actives sur la caséine, le collagène et l'élastine, mais surtout sur la kératine ; par contre, SUB5 ne dégrade pas ces substrats et pourrait donc avoir une spécificité plus particulière (Jousson *et al.*, 2004b).

Des exoprotéases sécrétées ont aussi été caractérisées chez *T. rubrum*. Les gènes codant pour une DPPIV et une DPPV de la famille S9, et pour deux leucine aminopeptidases de la famille M28 (LAP1 et LAP2) ont été isolés. La spécificité de ces enzymes au niveau du dipeptide ou de l'acide aminé qu'ils libèrent a été établie à l'aide d'une série de substrats fluorogéniques (Monod *et al.*, 2005).

Le tableau 3 reprend la situation dans la classification des protéases des principales protéases sécrétées des dermatophytes et des autres champignons.

**Tableau 3 :** Vue d'ensemble de la classification abrégée des protéases

Groupe catalytique	Clans	Familles	Sous-familles	Exemples
Protéases à sérine	PA	S1	S1A,B	Chymotrypsine (S1A)
	SB	S8	S8A,B	Subtilases sécrétées des dermatophytes (SUB) et ALP d' <i>Aspergillus</i> spp. (S8A)
	SC	S53	S9A,B,C,D	Sédolysines d' <i>Aspergillus fumigatus</i>
		S9		DPPIV (S9B) et DPPV (S9C) d' <i>Aspergillus</i> spp. et <i>Trichophyton rubrum</i> ; CD26 (S9B)
(...)	S15	(...)	Protéases PepX des lactocoques et streptocoques	
Métalloprotéases	MH	M28	M28A,B,C,E	Leucine aminopeptidases (LAP) d' <i>Aspergillus</i> spp. et de <i>Trichophyton rubrum</i> (M28E)
	MA	M34 M36		Facteur LF de <i>Bacillus anthracis</i> Métalloprotéases sécrétées des dermatophytes (MEP) et MEP/NPI d' <i>Aspergillus</i> spp.
	(...)	(...)		
Protéases aspartiques	AA	A1	A1A,B	Aspergillopepsine (A1A)
	(...)	A2	A2A,B,C,D,E,G	Protéases aspartiques de <i>Candida albicans</i> (Sap) (A1A)
		(...)	(...)	
Protéases à cystéine	CA	C1	C1A,B	Protéases à cystéine de <i>Entamoeba histolytica</i> (C1A)
	CD	C25		Gingipaïnes de <i>Porphyromonas gingivalis</i>
	(...)	(...)		
Protéases à thréonine				
Protéases glutamiques				

## Rôles dans la dégradation des substrats kératinisés

Etant donné que les structures kératinisées représentent l'habitat naturel exclusif des dermatophytes, il s'agit là du rôle pressenti d'emblée pour leurs protéases sécrétées, permettant à la fois d'obtenir des nutriments assimilables et d'envahir les tissus ; ce rôle a d'abord été confirmé *in vitro* par l'observation du haut pouvoir kératinolytique de certaines de ces enzymes, et plus tard par la faible croissance sur kératine constatée chez des souches mutées faiblement kératinolytiques (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006 ; Yamada *et al.*, 2006). De plus, chez *M. canis*, Viani *et al.* (2004) ont démontré que les souches les plus kératinolytiques *in vitro* étaient responsables *in vivo*, chez le cobaye, des lésions les plus marquées.

Si l'implication des protéases des dermatophytes dans la digestion des tissus kératinisés est bien établie, la question de la régulation et de la coordination de leur sécrétion pour digérer un substrat particulier reste à étudier.

Beaucoup de ces protéases, dont SUB3 et MEP3 chez *M. canis*, sont fortement exprimées lorsque la seule source d'azote disponible est constituée d'un substrat protéique macromoléculaire, y compris la kératine et d'autres protéines de matrice extracellulaire. Par contre, leur expression est faible ou nulle en présence de nutriments facilement assimilables, tels que glucose et oligopeptides (Mignon *et al.*, 1998a ; Brouta *et al.*, 2001 ; Jousson *et al.*, 2004a, b ; Monod *et al.*, 2005). Il est probable que leur production soit induite, au moins en partie, par une pénurie de ces nutriments simples. Le basculement dans l'activation des gènes pourrait être contrôlé par un facteur de transcription de la famille GATA ; en effet, chez beaucoup de champignons, ces facteurs à « doigt de zinc » induisent l'expression de toute une série de gènes selon la source d'azote disponible (Marzluf, 1997 ; Scazzocchio, 2000). Les produits des gènes *areA* d'*A. fumigatus*, et *nit-2* de *Neurospora crassa*, comptent parmi ces facteurs ; ils induisent l'expression de nombreux enzymes et perméases, parmi lesquels des protéases extracellulaires, permettant ainsi l'utilisation d'un substrat complexe. Chez certains champignons, pathogènes pour l'homme ou pour les plantes, les facteurs de la famille GATA ont été incriminés dans la pathogenèse de l'infection (Hensel *et al.*, 1998 ; Limjindaporn *et al.*, 2003 ; Pellier *et al.*, 2003) ; par contre, dans d'autres infections, ils semblent ne pas intervenir (Froeliger et Carpenter, 1996). Récemment, le gène codant pour l'équivalent de ces protéines chez *M. canis*, *dnr1*, a été isolé et inactivé par interruption génique. La perte fonctionnelle de *dnr1* a mené à une chute de l'activité protéolytique sécrétée, et à un important ralentissement de la croissance en présence de kératine comme unique source d'azote (Yamada *et al.*, 2006). Chez *T. rubrum*, l'expression des protéases alcalines, qui comprennent la majeure partie des

protéases sécrétées, est induite par un autre facteur de transcription à doigt de zinc, PacC, qui est activé à des pH élevés. L'inactivation de *pacC* a empêché à la fois la sécrétion d'activité kératinolytique et la croissance dans un milieu constitué de fragments d'ongles (Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006).

Les tissus kératinisés ne sont pas constitués que de kératine au sens strict, mais également d'une série d'autres protéines telles que la loritrine, l'involucrine et les *small proline rich proteins*. Ces protéines sont liées entre elles pour former un réseau complexe appelé *cornified cell envelope* (enveloppe cornée). Le modèle actuellement accepté quant à l'utilisation des protéases sécrétées par les dermatophytes, est un modèle de coopération entre endo- et exoprotéases pour digérer ce matériel protéique insoluble (Monod *et al.*, 2005). Les endoprotéases produiraient un grand nombre d'extrémités libres sur lesquelles pourraient agir les exoprotéases. Il est probable en effet que seuls des acides aminés et de petits peptides puissent être assimilés par les dermatophytes, via des transporteurs membranaires tels qu'il en existe chez les autres champignons (Becker et Naider, 1995 ; Lubkowitz *et al.*, 1997 ; Hauser *et al.*, 2001).

### **Rôles dans la modulation de la réponse immune**

La digestion du substrat n'est probablement pas le seul rôle des protéases sécrétées. En effet, de plus en plus d'éléments indiquent qu'elles ont également des fonctions en rapport direct avec la pathogénicité, en particulier dans la modulation de la réponse immune. En effet, comme cela a été montré pour les Saps de *C. albicans* (Naglik *et al.*, 2004), les protéases des dermatophytes pourraient avoir évolué pour s'adapter à la croissance *in vivo*, et avoir acquis des propriétés déterminant la différence entre une vie saprophytique et une vie parasitaire. Cela a été suggéré par Jousson *et al.* (2004b), suite à l'observation que les SUB sécrétées par *T. rubrum* ne sont pas toutes kératinolytiques et donc pourraient avoir d'autres fonctions, en particulier une fonction en rapport avec la réponse immune.

L'une des grandes caractéristiques des dermatophytoses est que les lésions causées peuvent être chroniques et non inflammatoires, ou au contraire aiguës et très inflammatoires, selon le degré d'adaptation de l'espèce fongique à son hôte et le statut physiopathologique de l'hôte. Cette modulation de la réponse immune pourrait relever en partie des protéases sécrétées. C'est ce qu'indiquent les résultats obtenus par Giddey *et al.* (2007a), montrant que le profil des protéines sécrétées en milieu inducteur – comprenant une majorité de protéases- est fortement variable entre espèces de dermatophytes ayant des hôtes différents et induisant des



expressions cliniques différentes. Cela est vrai également pour des souches différentes de *M. canis*, qui induisent les lésions les plus aiguës lorsqu'elles sont fortement kératinolytiques *in vitro* (Viani *et al.*, 2004). Il est donc possible que les protéases influencent les défenses immunes simplement en les stimulant plus ou moins selon le type ou la profondeur des dégâts qu'elles causent à l'épiderme, ce qui a déjà été suggéré par Dahl et Grando (1994). Cependant, la réponse immune spécifique est elle aussi l'objet d'une modulation, puisque deux protéases, la subtilase SUB6 (ou antigène Tri r 2) de *T. rubrum* et la DPPV (ou antigène Tri t 4) de *T. tonsurans*, peuvent être la cible de réponses immunes différentes en fonction du caractère aigu ou persistant de l'infection (*cf. infra*). Chez *M. canis*, bien que SUB3 et MEP3 soient effectivement immunogènes (Brouta *et al.*, 2003 ; Descamps *et al.*, 2003a ; Mignon *et al.*, 1999a, b), aucune différence au niveau de la réponse humorale envers SUB3 ou envers un surnageant de culture (exoantigène brut) contenant de nombreuses protéases n'a pu être démontrée entre chats de statuts cliniques différents (Mignon *et al.*, 1999a).

Tout comme Sap2 chez *C. albicans*, certaines protéases de dermatophytes pourraient cliver directement des médiateurs de la réponse immune. Ceci n'a, pour l'instant, pas été étayé.

### **Autres rôles**

La participation des protéases extracellulaires au processus d'adhérence n'a pas encore été étudiée chez les dermatophytes. Cependant, ce type de rôle est concevable même pour des protéases sécrétées ou liées en surface de façon non covalente. En effet, l'implication dans l'adhérence a été bien démontrée pour des Saps de *C. albicans* (Ollert *et al.*, 1993 ; Monod et Borg-von Zepelin, 2002 ; de Bernardis *et al.*, 2007), mais aussi notamment pour la protéine CbpG de *S. pneumoniae* (Mann *et al.*, 2006).

### **La sulphitolyse**

Les ponts disulfures entre résidus cystéine sont à la base de la résistance mécanique du réseau de kératine. Pour que le pouvoir lytique des protéases sécrétées puisse s'exercer sur la kératine, ces ponts doivent être rompus (Kunert, 1992; Jousson *et al.*, 2004b). Or, lors de la croissance sur kératine, les dermatophytes excrètent des sulphites, agents réducteurs capables de remplir ce rôle (Kunert, 1972). C'est très récemment que les mécanismes de la sulphitolyse ont été décrits et que l'importance capitale de ce phénomène a été soulignée ; l'excrétion de sulphites par les dermatophytes dépend d'un transporteur encodé par le gène *Ssul1*, remplissant

dans le même temps une fonction de détoxification, et pouvant constituer une future cible thérapeutique (Léchenne *et al.*, 2007).

### **Expression *in vivo***

Très peu de données sont publiées à ce jour quant au profil d'expression *in vivo* des protéases sécrétées. Les ARN messagers codant pour les protéases SUB1, SUB2, SUB3, MEP2 et MEP3 de *M. canis* ont été amplifiés *in vivo* par RT-PCR nichée (Brouta *et al.*, 2002 ; Descamps *et al.*, 2002), alors que seule SUB3 a été directement détectée par immunohistochimie au niveau des follicules pileux infectés chez le chat et le cobaye (Mignon *et al.*, 1998a, b).

### **3.2. L'ETABLISSEMENT DE L'INFECTION : ADHERENCE, GERMINATION, INVASION**

La cinétique d'adhérence des dermatophytes à la peau et à l'ongle a été étudiée à l'aide de différents modèles et techniques de microscopie. Ces travaux ont montré une augmentation régulière du nombre de spores adhérentes au cours du temps, l'adhérence étant suivie de la germination des spores et de l'invasion des structures cornées par des hyphes se développant dans de multiples directions. Zurita et Hay (1987) ont observé une adhérence maximale des arthroconidies à des kératinocytes en suspension après 3 à 4 heures. Aljebre et collaborateurs (1992, 1993) ont utilisé des feuillets de *stratum corneum ex vivo* ou des kératinocytes individualisés, et ont montré que l'adhérence d'arthroconidies de *T. mentagrophytes* est maximale à 6 heures et que leur germination commence à partir de 4 heures. Dans un modèle de lit d'ongle humain développé par Rashid et collaborateurs (1995a), l'adhérence et la germination de ces mêmes arthroconidies a été observée après 6 heures, et des filaments latéraux sont apparus à 16 heures. L'équipe de Duek (2004) a étudié les premières étapes de l'infection par *T. mentagrophytes* en utilisant des explants cutanés ; elle a montré que l'adhérence était maximale à 12 heures, que la germination débutait à 24 heures, et que les hyphes pénétraient dans le *stratum corneum* après 3 jours.

Très peu de choses sont connues quant aux facteurs permettant l'adhérence des dermatophytes. Des adhésines de type lectine exprimées à la surface des microconidies permettent l'adhérence de *T. mentagrophytes* et *T. rubrum* à des cellules épithéliales (Esquenazi *et al.*, 2003, 2004). D'un point de vue morphologique, des projections fibrillaires ont été

observées chez *T. mentagrophytes* durant la phase d'adhérence (Aljabre *et al.*, 1993 ; Kaufman *et al.*, 2007). A la surface de la peau, un petit nombre de longues fibrilles relie les arthroconidies entre elles et aux kératinocytes, tandis que dans les couches plus profondes de l'épiderme, les arthroconidies nouvellement formées sont entièrement couvertes de fibres fines et courtes. Ces dernières disparaissent lorsqu'une large surface de contact est établie entre la spore et la surface tissulaire (Kaufman *et al.*, 2007).

Dans une récente étude exhaustive du sécrétome de *T. rubrum* sur un milieu constitué de protéines, Giddey et collaborateurs (2007b) ont mis en évidence, à côté de nombreuses protéases, une céramidase qui pourrait jouer un rôle important dans l'établissement de l'infection.

### 3.3. FACTEURS IMMUNOMODULATEURS

Mis à part la possible intervention des protéases, les principaux mécanismes de modulation de la réponse immunitaire identifiés chez les dermatophytes sont l'inhibition de la multiplication des lymphocytes par les mannanes de paroi, l'interférence avec la fonction des macrophages, et l'activation différentielle des kératinocytes.

Les mannanes de paroi de *T. rubrum* (TRM, *Trichophyton rubrum mannans*) semblent posséder des propriétés immunosuppressives, à l'instar des mannanes de *C. albicans* (Romani, 2004). En fonction de la dose utilisée, ils sont capables d'inhiber *in vitro* la prolifération des lymphocytes mononucléés en réponse à différents antigènes (dermatophytiques ou non) et mitogènes. Paradoxalement, ils constituent eux-mêmes un antigène majeur du point de vue de la stimulation des cellules T (Blake *et al.*, 1991a ; MacCarthy *et al.*, 1994). Bien que des lymphocytes T suppresseurs soient activés durant les infections persistantes (Dahl et Grando, 1994), les cellules cibles pour l'action des TRM sont probablement les monocytes (Grando *et al.*, 1992a), chez qui ils pourraient interférer avec le processus de présentation de l'antigène. Les TRM pourraient également inhiber le renouvellement du *stratum corneum*, directement ou via l'inhibition de la fonction d'autres cellules du système immunitaire (Grando *et al.*, 1992b ; Dahl, 1993). La structure fine des mannanes des dermatophytes a été précisée par Ikuta et collaborateurs (1997), qui ont fait remarquer des différences entre ceux-ci et les mannanes d'autres espèces fongiques ; les mêmes auteurs ont suggéré que la technique de purification des mannanes pourrait être impliquée dans l'effet immunoinhibiteur observé pour ces molécules. De plus, Blake et son équipe (1991b) ont mis en évidence des différences entre les mannanes de différents dermatophytes, tant au niveau de leur quantité que de leurs propriétés inhibitrices.

Malgré ces nombreuses investigations, le mécanisme régissant les propriétés immunomodulatrices des TRM reste inconnu. Campos et collaborateurs (2006) ont suggéré qu'elles pourraient simplement résulter de la saturation des récepteurs à mannose à la surface des macrophages, avec pour conséquence l'empêchement de la phagocytose.

Le rôle central des kératinocytes dans la modulation de la réponse immune anti-dermatophytes a par ailleurs été confirmé, et quelque peu éclairci. La quantité d'Il-1 $\alpha$  produite par des kératinocytes en contact avec *T. rubrum* est significativement plus faible que celle induite par *T. mentagrophytes* ; cela pourrait rendre compte de la différence entre ces deux types d'infection au niveau de leur expression clinique (Ogawa *et al.*, 1998). De plus, la faible sécrétion de cytokines par des kératinocytes humains co-cultivés avec *T. tonsurans*, comparativement à *Arthroderma benhamiae*, pourrait être une explication à l'atténuation de la réponse inflammatoire observée pour cette espèce (Shiraki *et al.*, 2006).

Les phagocytes sont également des éléments importants parmi les défenses anti-dermatophytes. Gregurek-Novak (2004) a montré que les fonctions de ces cellules étaient déficientes chez des patients infectés par *T. mentagrophytes*. Dans l'étude menée par Campos *et al.* (2006), le comportement *in vitro* de macrophages incubés avec *T. rubrum* a été analysé. Les conidies de *T. rubrum* sont ingérées par les macrophages et s'y différencient en hyphes, provoquant finalement la rupture de leur membrane. Parallèlement, alors que la sécrétion par les macrophages d'Il-10, une cytokine anti-inflammatoire, est augmentée en présence de *T. rubrum*, la production de facteurs de type pro-inflammatoire est inhibée. Il s'agit de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (MHC II, *major histocompatibility complex class II*), des molécules de costimulation CD54 et CD80, d'Il-12 et d'oxyde nitrique. La production de TNF- $\alpha$  est stimulée chez les macrophages infectés ; cette cytokine n'est pas habituellement associée à l'atténuation de la réponse immune, mais peut dans certains cas favoriser la croissance intracellulaire d'agents pathogènes (Engele *et al.*, 2002).

De façon plus anecdotique, Calderon et Shennan (1987) ont montré que la catalase produite par *T. rubrum* et *T. quinckeanum* pourrait leur permettre de résister au peroxyde d'hydrogène produit par les PMN.

Chez plusieurs autres champignons pathogènes, un mécanisme d'immunoévasion via la reconnaissance différentielle de récepteurs de l'immunité innée, les TLR (*Toll-like receptors* ; *cf. infra*), a été mis en évidence. A ce jour, rien n'est connu quant à l'interaction des dermatophytes avec ces récepteurs.

#### **4. Les mécanismes de défense de l'hôte vis-à-vis des dermatophytes**

Avant que n'intervienne le système immunitaire, des mécanismes de défense non immuns s'opposent à l'établissement de l'infection. La surface de la peau intacte constitue un premier obstacle, en raison de son exposition aux rayons ultraviolets, de ses conditions de faible humidité, et de la compétition avec la flore microbienne commensale. Le renouvellement continu du *stratum corneum* suite à la prolifération épidermique et au processus de kératinisation repousse mécaniquement les éléments infectants. La peau et ses sécrétions contiennent aussi des substances présentant des propriétés anti-fongiques, comme certains acides gras saturés du sébum. D'autre part, la transferrine insaturée, protéine sérique pouvant diffuser vers le derme et l'épiderme lors d'inflammation, inhibe la croissance des dermatophytes en captant le fer nécessaire à celle-ci. Elle est probablement l'un des éléments empêchant les dermatophytes d'envahir des structures plus profondes que l'épiderme (King *et al.*, 1975 ; Rashid *et al.*, 1995b).

Malgré leur localisation superficielle, les dermatophytes sont la cible d'une réponse immune à la fois innée et spécifique. En outre, il existe une interrelation entre les dermatophytoses chroniques et les maladies allergiques, probablement complexe et en tout cas mal comprise (Woodfolk, 2005).

##### **4.1. IMMUNITE INNEE**

Les acteurs de l'immunité innée anti-dermatophytes sont les phagocytes - PMN et macrophages -, les kératinocytes, les cellules de Langerhans (LC), qui sont les représentantes des cellules dendritiques au niveau de l'épiderme, et, potentiellement, le complément. Les mécanismes d'activation de toutes ces cellules et leurs interactions entre elles et avec les acteurs de l'immunité spécifique sont très mal connus dans le cas des dermatophytoses, mais pourraient être analogues à ceux mis en évidence par des recherches effectuées chez d'autres champignons pathogènes. Celles-ci mettent en particulier l'accent sur la reconnaissance spécifique d'éléments fongiques par une série de récepteurs présents à la surface des cellules de l'immunité innée. En effet, comme tous les microorganismes, les champignons portent des motifs moléculaires universels propres au monde microbien et reconnus par le système immunitaire comme faisant partie du non-soi. Ces signaux appelés *Pathogen Associated Molecular Patterns* (PAMP) sont reconnus par une série de récepteurs spécifiques, les *PAMP Recognition Receptors* (PRR), qui comprennent notamment les récepteurs de type Toll (TLR,

*Toll-like receptors*), les récepteurs de type dectine, et le récepteur à mannose (*MR, mannose receptor*).

Lors de la colonisation de l'épiderme par un dermatophyte, les premières cellules entrant en contact avec le champignon sont les kératinocytes. Ces cellules ne remplissent pas qu'un rôle passif de barrière physique contre les infections, mais jouent un rôle actif, peut-être même prépondérant, dans l'induction et l'orientation de la réponse immune face à un pathogène cutané (Steinhoff *et al.*, 2001). Les stocks d'Il-1 préformée libérés par les kératinocytes lésés sont à la base de l'état inflammatoire généré lors d'agression cutanée; l'Il-1 a entre autres une action auto-activatrice sur ces cellules. Les kératinocytes co-cultivés avec *T. mentagrophytes* produisent une série de cytokines (Shiraki *et al.*, 2006), parmi lesquelles l'Il-8, une chémokine capable d'attirer et d'activer les PMN (Ogawa *et al.*, 1998; Nakamura *et al.*, 2002), ainsi que le TNF- $\alpha$ , une cytokine pro-inflammatoire (Nakamura *et al.*, 2002). Les kératinocytes peuvent également sécréter des peptides antimicrobiens. Ceux-ci constituent un mécanisme de défense non spécifique très ancien d'un point de vue évolutif (Shai *et al.*, 2006); ils agissent essentiellement en perméabilisant les membranes cellulaires, mais peuvent aussi activer des cellules du système immunitaire. Les cellules épidermiques en présence de *T. rubrum* augmentent leur expression de  $\beta$ -défensine 2 humaine (hBD-2) et de cathélicidine LL-37, deux peptides possédant une activité fongicide envers ce champignon (Lopez-Garcia *et al.*, 2006; Jensen *et al.*, 2007). En outre, la vitesse de remplacement du *stratum corneum*, et donc la prolifération des kératinocytes, augmente en cas de dermatophytose (Berk *et al.*, 1976).

Ces différents aspects de l'activation des kératinocytes sont probablement liés, en partie du moins, à l'interaction de PAMP avec les PRR dont les kératinocytes sont pourvus; ceux-ci comprennent entre autres le TLR2, le TLR4 et le MR (Roeder *et al.*, 2004). Ces cellules peuvent également répondre aux hsp (*heat shock proteins*, protéines de choc thermique) d'origine microbienne (Zhang *et al.*, 2001) ou produites par des cellules hôtes (Pleguezuelos *et al.*, 2005). Parallèlement, les lésions causées aux kératinocytes lors de l'infection, mécaniques ou induites par les enzymes extracellulaires, peuvent provoquer la libération de différents facteurs alertant d'autres cellules comme les LC. On retrouve parmi ces facteurs l'Il-1, ainsi que des hsp.

Les premières cellules mobiles arrivant au niveau du site d'infection par un dermatophyte sont les PMN. Ceux-ci s'infiltrent en grande quantité au niveau du site d'infection (Szepes *et al.*, 1993); chez la souris infectée par *T. quinckeanum*, ils s'y accumulent en 4 à 6 heures (Hay *et al.*, 1988). Kahlke et collaborateurs (1996) ont montré que les dermatophytes, comme sans doute d'autres champignons, produisent un facteur de nature

lipidique possédant des propriétés attractives et activatrices envers les PMN. Tout comme les macrophages, les PMN détruisent les éléments fongiques après les avoir phagocytés, les premiers étant également capables de détruire les hyphes sans les internaliser ; l'activité cytotoxique des PMN n'est cependant que transitoire (Calderon et Hay, 1987). Selon Dahl et Carpenter (1986), seules les conidies, et non les hyphes, pourraient être tuées par les PMN. Le pouvoir fongicide des macrophages semble nettement moindre que celui des PMN ; toutefois, ceux-ci deviennent probablement les cellules effectrices majeures à un stade plus avancé de l'infection, lorsqu'ils sont adéquatement activés par le biais de la réponse immune spécifique. Les principaux facteurs via lesquels les phagocytes exercent leurs propriétés destructrices sont les agents oxydants, dont les radicaux libres dérivés de l'oxygène, les peptides antimicrobiens, et l'oxyde nitrique (NO) dans le cas des macrophages. Le rôle des phagocytes en tant que médiateurs influençant l'orientation de la réponse immune anti-fongique est mal connu mais est sans doute important. En tout cas, dans des modèles d'infection *in vitro*, les PMN et les macrophages en contact avec *C. albicans* produisent des facteurs pro-inflammatoires qui contribuent à l'orientation de la réponse immune spécifique (Schaller *et al.*, 2004 ; Fradin *et al.*, 2007).

Si différents types de cellules portent des PRR, le rôle crucial joué par ces récepteurs apparaît surtout au niveau des cellules dendritiques. Celles-ci constituent la pierre angulaire de l'activation de l'immunité spécifique, car ce sont elles qui recrutent les cellules T naïves au niveau des ganglions lymphatiques. En traduisant l'information reçue via les PRR par des signaux de costimulation adéquats, elles induisent la mise en place d'une réponse immunitaire sur mesure et notamment la différenciation des cellules T en types Th1, Th2 ou Th0. De plus, dans le cas particulier des champignons, chaque morphotype est reconnu différemment par les PRR et déclenche une réponse spécifique. En ce qui concerne les dermatophytes, l'activation de cellules de type Th1, produisant en particulier de l'IFN- $\gamma$ , est un événement crucial au cours de la réponse immune. En effet, la production de cette cytokine par les leucocytes mononucléés est associée à l'élimination efficace de l'infection (Slunt *et al.*, 1996 ; Ogawa *et al.*, 1998 ; Woodfolk et Platts-Mills, 2001).

Les effets de la reconnaissance des champignons pathogènes par les différents PRR ont été principalement investigués chez *C. albicans*, *A. fumigatus* et *Cryptococcus neoformans*, à l'aide notamment de modèles d'infection *in vivo* utilisant des animaux déficients au niveau d'un ou plusieurs PRR (pour revue : Roeder *et al.*, 2004 ; Netea *et al.*, 2007). De façon générale, la reconnaissance de structures fongiques par le TLR4, probablement des mannanes ou des mannoprotéines, apparaît comme un événement clé dans l'activation d'une réponse

immune efficace; elle mène en effet à la production d'importants facteurs pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , l'Il-12, l'Il-1 $\beta$ , et au recrutement de PMN par l'intermédiaire de chémokines, en particulier l'Il-8 (Netea *et al.*, 2002 ; Tada *et al.*, 2002 ; Bellochio *et al.*, 2004). Par contre, la reconnaissance par le TLR2, se liant potentiellement à des phospholipomannanes, semble mener à la production de cytokines de type Th2/Th0, par exemple l'Il-10, à l'activation de cellules T immunosuppressives, et à l'inhibition de la fonction des macrophages (Re et Strominger, 2001 ; Dillon *et al.*, 2004 ; Netea *et al.*, 2004 ; Blasi *et al.*, 2005 ; Suttmüller *et al.*, 2006). Il serait pourtant erroné de croire que chaque PRR active indépendamment une voie de l'immunité innée. En réalité, ces récepteurs agissent souvent de façon coopérative, et il n'est pas rare que la collaboration entre PRR passe par la formation d'hétérodimères. Par exemple, la reconnaissance des  $\beta$ -glucanes fongiques par la dectine-1 influence positivement la production de facteurs pro-inflammatoires déclenchée par la stimulation du TLR2 (Gantner *et al.*, 2003). Bien que le type de composé interagissant avec chaque PRR soit connu ou suspecté, les structures moléculaires fines reconnues par ces récepteurs demeurent inconnues (Netea *et al.*, 2007).

Les champignons pathogènes sont capables de détourner le système de reconnaissance par les PRR afin d'échapper à la réponse immune. Les effets régulateurs anti-inflammatoires liés à l'activation du TLR2 correspondent probablement au ralentissement normal de toute réaction inflammatoire ; cependant, ils peuvent être exagérés ou prématurés dans certaines situations où le champignon évite la stimulation adéquate du TLR4. C'est ainsi que la formation d'hyphes par *A. fumigatus* (Netea *et al.*, 2003) et *C. albicans* (van der Graaf *et al.*, 2005) constitue un mécanisme d'évasion de la réponse immune, puisqu'ils ne peuvent être reconnus par le TLR4 alors que les signaux transmis via le TLR2 restent intacts. Dans le cas de *C. albicans*, Gantner et collaborateurs (2005) ont montré que les  $\beta$ -glucanes reconnus par la dectine-1 lors du contact avec la forme levure du champignon, ne remplissent plus ce rôle après le passage à la forme filamenteuse, car ils y sont masqués par une couche de mannanes. De façon similaire, *C. neoformans* évite de déclencher la voie d'activation dépendant du TLR4 grâce aux glucuronoxylomannanes (GXM) de sa capsule. En effet, ceux-ci occupent le récepteur mais sans qu'ait lieu la transduction du signal en aval (Shoham *et al.*, 2001).

Très peu d'informations sont disponibles actuellement en ce qui concerne l'activation des PRR par les dermatophytes. Les hyphes de *T. rubrum* et de *M. andouinii* se lient à la dectine-2, et ce de façon préférentielle par rapport aux conidies (Sato *et al.*, 2006). La même étude a montré que la dectine-2 est incapable à elle seule d'induire la transduction du signal, mais qu'elle le fait en interagissant avec le récepteur à fragment Fc $\gamma$  (RFc $\gamma$ ) présent comme elle



à la surface des macrophages, ce qui se traduit notamment par une augmentation de la sécrétion de TNF- $\alpha$ .

Peu de données sont disponibles quant au rôle joué par le complément dans l'immunité anti-dermatophytes. *T. rubrum* est capable d'activer le complément par la voie alterne *in vitro* (Swan *et al.*, 1983 ; Davies et Zaini, 1984). Ce faisant, il peut attirer les PMN et exacerber leurs mécanismes destructeurs (Dahl et Carpenter, 1986). Toutefois, rien ne permet d'affirmer que les composants du complément sont présents en quantité suffisante dans l'épiderme que pour y jouer un rôle significatif. Richardson et Bell (1995) ont montré que les arthroconidies de *T. mentagrophytes* pouvaient être phagocytées efficacement par les PMN sans être opsonisées, ni par le complément, ni par des anticorps ; cette propriété pourrait permettre l'élimination des dermatophytes dans des sites peu accessibles aux opsonines.

## 4.2. REACTION INFLAMMATOIRE

L'action conjointe de l'immunité innée et de la réponse spécifique ou adaptative envers les dermatophytes se traduit par la réaction inflammatoire. Cette dernière constitue le bras effecteur de l'immunité anti-dermatophytes.

Comme déjà évoqué, l'importance de la réaction inflammatoire pour l'élimination d'une dermatophytose est démontrée par la relation inverse qui existe entre l'intensité de l'inflammation observée au niveau des lésions et la durée de l'infection : plus les lésions sont inflammatoires, moins elles persistent. Le caractère plus ou moins inflammatoire d'une dermatophytose dépend du couple hôte-espèce fongique. Les dermatophytes peu adaptés à leur hôte provoquent généralement des lésions marquées mais relativement rapidement éliminées ; c'est le cas par exemple lorsque *T. verrucosum*, qui a pour hôte naturel le bovin, infecte l'homme. L'évolution de l'infection peut aussi varier selon le statut physiopathologique de l'hôte ; ce phénomène est illustré par les infections chroniques inapparentes observables chez certains chats infectés par *M. canis*, ou encore par certaines dermatophytoses persistantes à *Trichophyton* spp. chez l'homme (Woodfolk *et al.*, 1998). La résolution rapide de l'infection est également liée à une résistance ultérieure face à la réinfection.

Les acteurs principaux de la réaction inflammatoire lors de dermatophytose semblent être les macrophages. Ces cellules font partie du système immunitaire non spécifique, mais deviennent de puissants destructeurs grâce à l'intervention des cellules T auxiliaires (*helpers*, CD4+). Plusieurs travaux ont montré que les macrophages et les cellules T s'accumulent en quantité importante au niveau du derme et des couches inférieures de l'épiderme, à proximité

immédiate des éléments fongiques (Green *et al.*, 1983; Hay *et al.*, 1988; Brasch et Sterry, 1992 ; Koga *et al.*, 2001b).

### 4.3. IMMUNITE SPECIFIQUE

#### Réponse cellulaire

Le recrutement de cellules T spécifiques est indispensable pour éliminer une infection dermatophytique. Le transfert adoptif de lymphocytes de souris infectées par *T. quinckeanum* à des souris naïves protège ces dernières contre une infection, tandis que le transfert de sérum n'a aucun effet (Calderon et Hay, 1984). La résolution de l'infection s'accompagne également d'une réponse lymphoproliférative (Kerbs *et al.*, 1977 ; Stahl et Svejgaard, 1982), tout comme la protection vaccinale (*cf. infra*). En outre, chez les personnes déficientes au niveau de l'immunité cellulaire, comme les malades du SIDA ou ceux subissant une corticothérapie, on constate une sensibilité accrue aux dermatophytoses et une tendance à développer des lésions très étendues, ce qui témoigne aussi de l'importance de l'immunité cellulaire (CMI, *cell-mediated immunity*) pour le contrôle de ces infections.

L'activation des lymphocytes T n'est toutefois pas suffisante en soi pour obtenir une réponse efficace. La réponse cellulaire adéquate est dite « de type hypersensibilité retardée » (DTH, *delayed-type hypersensitivity*). Il s'agit d'une branche de la CMI caractérisée par l'intervention des macrophages comme cellules effectrices, et par un profil cytokinique de type Th1 dominé par l'IFN- $\gamma$ . Elle peut être mise en évidence par des tests cutanés : le rappel de ce type de réponse suite à l'injection intradermique d'un antigène se traduit par l'apparition d'un érythème et d'un gonflement marqués au site d'injection, en général après 24 à 48 heures. De très nombreuses études montrent que des tests cutanés positifs envers un extrait dermatophytique sont la signature d'une immunité efficace, puisqu'ils accompagnent la résolution de l'infection aiguë et correspondent à une protection ultérieure.

Chez l'homme, l'infection par les dermatophytes anthropophiles *T. rubrum* et *T. tonsurans* peut évoluer de deux manières, d'un point de vue à la fois clinique et immunologique. Jones (1993) a montré que les personnes atteintes de dermatophytose inflammatoire et rapidement résolue présentent une réponse cutanée positive envers la trichophytine (un extrait antigénique brut de *Trichophyton* spp.), alors que celles souffrant d'une infection chronique ne développent pas cette réponse, mais réagissent au test cutané par une réaction de type hypersensibilité immédiate (IH, *immediate hypersensitivity*). Cette réaction

qui apparaît endéans les 5 à 20 minutes est provoquée par la dégranulation de mastocytes suite au pontage d'IgE liées à leur surface, et associée à un profil cytokinique de type Th2. La réponse cutanée de type IH chez des patients infectés chroniques a ensuite été associée à des titres importants en IgE non spécifiques et en IgG4 spécifiques de *T. rubrum*, alors que la réponse lymphoproliférative de ces personnes était normale (Leibovici *et al.*, 1995). La même dichotomie au niveau des tests cutanés a été observée par Woodfolk et collaborateurs (1996), mais, qui plus est, ces auteurs ont démontré que ces différentes réponses pouvaient être induites par une seule et même protéine antigénique de *T. tonsurans*, la protéine IV. En outre, la persistance de l'infection et la réponse de type IH sont associées à des taux élevés d'IgE, d'IgG4, et d'IgG totales envers cette protéine. La protéine IV a été par la suite appelée antigène Tri t 4, et se trouve être la dipeptidyl peptidase V de *T. tonsurans* (Woodfolk *et al.*, 1998). Parallèlement, un autre antigène, la subtilisine SUB6 de *T. rubrum* aussi dénommée Tri r 2, s'est avéré avoir la même capacité d'induire deux types de réponses cutanées correspondant à deux évolutions de l'infection. Suite à l'analyse de la réponse lymphoproliférative envers une série de peptides dérivés de Tri r 2, la différence entre les deux réponses a pu être quelque peu éclaircie; en effet, les réponses lymphoprolifératives des patients IH et DTH sont dirigées contre des peptides différents (Woodfolk *et al.*, 2000).

La dualité de la réponse immune anti-dermatophytes apparaît également au niveau des cytokines produites. En réponse à une stimulation par la trichophytine, les leucocytes mononucléés de patients atteints de dermatophytose aiguë produisent de l'IFN- $\gamma$  en quantité importante comparativement à ceux de patients souffrant d'une infection persistante (Koga *et al.*, 1993, 1995a; Ogawa *et al.*, 1998); une différence similaire entre individus infectés de façon aiguë ou chronique a été observée quant à la production de GM-CSF par ces cellules (Koga *et al.*, 1994, 1995b). De même, les leucocytes mononucléés de patients à réponse cutanée DTH, stimulés par des antigènes dermatophytiques, sécrètent de l'IFN- $\gamma$ , de l'Il-4 et de l'Il-5 selon un rapport supérieur à 20:1, ce qui correspond à un profil Th1 (Slunt *et al.*, 1996). Un rapport inférieur à 2:1, traduisant un profil Th2, est par contre observé en cas de réponse IH. Chez des personnes atteintes de *tinea pedis*, la production d'IFN- $\gamma$  par ces mêmes cellules est élevée tant en cours d'infection qu'après guérison (Koga *et al.*, 2001a). Au moyen d'une technique immunohistochimique, Koga et collaborateurs (2001b) ont également démontré la présence au sein de l'infiltrat cellulaire du foyer infectieux des lymphocytes producteurs d'IFN- $\gamma$ .

Il apparaît donc que des antigènes dermatophytiques sont capables d'induire deux types de réponses immunes. L'une, aboutissant à la résolution de l'infection via une réaction

inflammatoire, fait intervenir des lymphocytes Th1 produisant en particulier de l' IFN- $\gamma$  et se manifeste par une réponse cutanée de type DTH. L'autre ne permet pas de contrôler efficacement l'infection ; elle est de type Th2 et correspond à des taux élevés d'anticorps spécifiques, y compris des IgE et des IgG4. Cependant, le profil cytokinique de la réponse efficace semble ne pas être un profil Th1 tout à fait classique. En effet, bien que la réponse lymphoproliférative des sujets DTH envers Tri r 2 soit dominée par l' IFN- $\gamma$ , celle induite par le peptide immunogène majeur (P5) dérivé de Tri r 2 provoque surtout une production d'Il-5 et d'Il-10, des cytokines Th2 (Woodfolk et Platts-Mills, 2001). C'est peut-être en partie pour cette raison que les réponses cutanées de certains individus sont mixtes ou atypiques (Woodfolk, 2005).

Même si un mélange de cellules T CD4+ et CD8+ est observé au site d'infection par des dermatophytes (Koga *et al.*, 2001b), le rôle des lymphocytes T cytotoxiques face à ces champignons est inconnu. De façon générale, ces cellules peuvent exercer une activité antifongique directe, et apparaissent comme des effecteurs efficaces même sans la fonction auxiliaire des lymphocytes T CD4+ (Romani, 2004).

### **Réponse humorale**

S'il est évident que les infections par des dermatophytes induisent la production de toute une variété d'anticorps spécifiques, il n'y a apparemment pas de corrélation entre les titres en anticorps spécifiques totaux et la guérison ou l'évolution de l'infection. Comme mentionné plus haut, des taux d'anticorps élevés, en particulier d'isotype IgE, sont mêmes plutôt associés aux dermatophytoses chroniques (Dahl, 1987 ; Woodfolk *et al.*, 1996), et le transfert d'anticorps ne permet pas de protéger contre l'infection (Calderon et Hay, 1984). En outre, l'analyse immunohistochimique de l'infiltrat cellulaire lors de *tinea capitis* montre une présence significative de lymphocytes B uniquement dans les cas d'infections chroniques (Koçak *et al.*, 2002).

Cependant, chez d'autres champignons pathogènes pour lesquels la réponse humorale a longtemps été réputée insignifiante du point de vue de la protection, on constate de plus en plus que des anticorps dirigés contre des antigènes ou des épitopes particuliers peuvent être protecteurs. La réponse humorale contre ces organismes, apparemment inefficace lors d'une infection naturelle, pourrait en réalité être un adjuvant important de l'immunité cellulaire, et, en tout cas, des anticorps protecteurs peuvent être obtenus en utilisant les candidats immunogènes adéquats (Casadevall *et al.*, 2002).

## **Immunité spécifique anti-*M. canis***

Comme pour les autres dermatophytoses, une première infection par *M. canis* chez le chat conduit à une protection ultérieure, même si celle-ci est relative (Sparkes *et al.*, 1996). Les chats infectés naturellement par *M. canis* développent des taux significatifs d'IgG et d'IgM dirigés contre un extrait antigénique brut de ce champignon (antigène M), et ce malgré une importante variabilité (Sparkes *et al.*, 1993b). Chez des chats infectés expérimentalement, l'étude de la cinétique de la réponse humorale a démontré l'apparition d'IgM et d'IgG contre l'antigène M, respectivement deux et six semaines après l'infection, soit huit et quatre semaines avant le début de la guérison clinique (Sparkes *et al.*, 1995). Une réponse spécifique en anticorps chez des chats guéris de teigne à *M. canis* a également été mise en évidence grâce à un antigène glycoprotéique de paroi (antigène GP ; DeBoer et Moriello, 1993), ou un exoantigène brut correspondant au surnageant de culture de *M. canis* propagé dans un milieu constitué de kératine féline comme unique source d'azote (Mignon *et al.*, 1999a). Le cobaye infecté par *M. canis* développe lui aussi une réponse en anticorps envers l'exoantigène brut (Mignon *et al.*, 1999b). La réponse humorale dirigée contre les protéases SUB3 et MEP3, deux composants majeurs de l'exoantigène brut, a été étudiée en utilisant ces protéines sous forme recombinante. Étonnamment, SUB3 semble n'induire de réponse humorale ni chez le chat (Mignon *et al.*, 1999b), ni chez le cobaye (Descamps *et al.*, 2003a) ; MEP3 quant à elle induit la production d'anticorps spécifiques chez le cobaye (Brouta *et al.*, 2003).

Les réponses lymphoproliférative et DTH envers *M. canis* ont également été investiguées. Une réponse lymphoproliférative a été mise en évidence envers différents antigènes bruts, chez des chats infectés naturellement (DeBoer et Moriello, 1993) ou expérimentalement (Sparkes *et al.*, 1995) ; l'induction de cette réponse est corrélée temporellement avec la régression des signes cliniques (Sparkes *et al.*, 1995). La plupart des animaux guéris de teigne à *M. canis* développent des intradermoréactions de type DTH. C'est le cas envers l'antigène GP chez le chat (DeBoer *et al.*, 1991 ; Moriello *et al.*, 2003), et envers l'exoantigène brut chez le cobaye (Mignon *et al.* 1999b). Cette réponse n'est pas observée en cours d'infection (Moriello *et al.*, 2003). SUB3 et MEP3 recombinants induisent toutes deux une réponse lymphoproliférative chez le cobaye (Descamps *et al.*, 2003 ; Brouta *et al.*, 2003) ; SUB3, qui n'induit pas de réponse en anticorps significative, provoque une réponse DTH cutanée significative mais faible (Mignon *et al.*, 1999b).

Robinson et collaborateurs (2000) ont étudié par immunohistochimie l'infiltrat cellulaire généré par l'injection intradermique d'une préparation antigénique brute de *M. canis* chez le

chat. Ils ont montré que 48 h après l'injection, les éosinophiles et les mastocytes étaient prédominants, malgré la présence significative de macrophages et de lymphocytes. A 72 h, les macrophages et lymphocytes forment l'essentiel de l'infiltrat, ces derniers étant représentés à parts égales par des cellules CD4+ et CD8+, avec peu ou pas de lymphocytes B. Dans cette même étude, le nombre de cellules exprimant le MHC II augmente entre 48 et 72 h, pour finalement concerner la majorité des cellules présentes; en particulier, le MHC II est exprimé par les cellules de Langerhans.

Il faut noter par ailleurs que la réponse immunitaire développée face à l'infection par *M. canis* induit des réactions croisées vis-à-vis d'autres espèces de dermatophytes, tant au niveau des anticorps que des réactions cutanées (Pier *et al.*, 1995).

## **5. La vaccination contre les dermatophytoses**

### **5.1. VACCINS COMMERCIAUX**

Les seuls vaccins anti-fongiques sur le marché actuellement sont des vaccins vétérinaires contre les dermatophytoses. Il s'agit dans tous les cas de vaccins entiers, inactivés ou atténués, et donc susceptibles de poser des problèmes de sécurité et d'innocuité. Très peu d'informations sont disponibles quant à leur efficacité, à la durée de la protection qu'ils induisent, ou encore à leurs effets secondaires. Beaucoup d'entre eux ont également une indication thérapeutique.

Un vaccin constitué d'une souche atténuée de *T. verrucosum* a été développé en Russie durant les années 1960 et est devenu le premier vaccin anti-dermatophytes efficace. Son utilisation dans le cadre de programmes prophylactiques à grande échelle en Europe de l'Est et dans les pays scandinaves a contribué à la réduction drastique de l'incidence de l'infection dans les élevages de bovins, et indirectement chez l'homme (Gudding et Naess, 1986). Ce vaccin a été commercialisé sous le nom de Ringvac® (Intervet), mais n'est actuellement plus disponible en Belgique. Un autre vaccin contre la dermatophytose bovine, l'Insol Trichophyton® (Boehringer), est enregistré en Belgique. Il s'agit d'un vaccin trivalent constitué de souches inactivées de *T. verrucosum*, *T. mentagrophytes* et *T. sarkisovii*, à injecter par voie intramusculaire. En Europe de l'Est et en Allemagne, la firme Bioveta commercialise une série de vaccins contenant des souches atténuées ou inactivées de différentes espèces de dermatophytes. Par exemple, le Trichobin® et le Trichoben® contiennent respectivement des microconidies *T. verrucosum* vivantes thermosensibles et inactivées au formol associées à de

l'hydroxyde d'aluminium. On trouve aussi parmi eux un vaccin inactivé dirigé contre *M. canis*, le Biocan M®. Un autre vaccin inactivé indiqué pour la prévention et le traitement de la teigne féline à *M. canis* était jusqu'il y a peu disponible aux Etats-Unis (Fel-O-Vax MC-K®, Fort Dodge); il semble peu efficace (DeBoer *et al.*, 2002) et pourrait même provoquer une aggravation des symptômes lorsqu'il est administré à des chats infectés (Scott *et al.*, 2001). En Russie et dans certains pays voisins, un vaccin contenant des microconidies de souches atténuées de *M. canis* et *T. mentagrophytes* (Microderm®) est enregistré et destiné au chat, au chien, au lapin et aux animaux à fourrure (Manoyan *et al.*, 2000). En Belgique, un vaccin inactivé commercialisé sous le nom d'Insol Dermatophyton® (Boehringer) a pour espèces cibles le chat, le chien et le cheval. Il contient des souches fongiques appartenant à plusieurs espèces différentes de dermatophytes, dont *M. canis*, *T. mentagrophytes* et *T. equinum*.

## 5.2. VACCINS EXPERIMENTAUX

A une seule exception près (Raska *et al.*, 2004), les vaccins anti-dermatophytes évalués jusqu'à présent sont soit entiers, soit très peu caractérisés.

Des vaccins atténués ont été développés dans le cadre de la lutte contre les dermatophytoses causées par *T. equinum* chez le cheval (Pier et Zancanella, 1993), et par *T. mentagrophytes* chez les animaux à fourrure (Mac Enzie *et al.*, 1986). Ils n'ont été que faiblement efficaces. Raska et collaborateurs (2004) ont quant à eux comparé l'efficacité de deux vaccins à base de la protéine hsp60 de *T. mentagrophytes*, l'un sous forme de protéine recombinante, l'autre sous forme d'ADN, et ce chez le veau et le cobaye. Les deux vaccins n'ont permis qu'une protection partielle, le vaccin génétique étant toutefois nettement plus efficace que son équivalent sous forme de protéine.

Des essais de vaccination anti-*M. canis* ont été réalisés chez le cobaye. S'inspirant des résultats probants obtenus lors d'essais de vaccination au moyen de fractions ribosomiales de bactéries, protozoaires ou champignons, Elad et Segal (1994) ont testé la fraction ribosomiale de *M. canis* comme agent vaccinal. La vaccination a induit une réponse humorale et lymphoproliférative et a entraîné une diminution significative de la durée de la maladie après l'infection d'épreuve. De même, Pier et collaborateurs (1995) ont utilisé un vaccin inactivé constitué de souches fongiques appartenant à diverses espèces de dermatophytes (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. equinum*, *T. mentagrophytes*), qui a permis de protéger les animaux contre une infection expérimentale par *M. canis*. Dans cette étude, la vaccination a induit une réponse spécifique, à la fois en anticorps et lymphoproliférative. Enfin, une étude contestable sur un

vaccin inactivé monovalent protégeant des cobayes vis-à-vis de *M. canis* et induisant une réponse lymphoproliférative a également été publiée (Wawrzekiewicz et Ziolkowska, 1996).

Chez le chat, les premiers essais de vaccination contre *M. canis* concernent un vaccin constitué d'un extrait brut de paroi fongique, administré par voie intradermique. Les chatons vaccinés y ont été soumis à une épreuve d'infection par inoculation (DeBoer et Moriello, 1994) ou par contact avec un chat infecté (DeBoer et Moriello, 1995b). La vaccination a induit une réponse en anticorps comparable, mais une prolifération lymphocytaire inférieure, à celles observées lors d'une infection naturelle ; tous les chats vaccinés ont développé des lésions de dermatophytose. Les mêmes auteurs ont obtenu des résultats similaires en utilisant un vaccin combiné atténué-inactivé, ainsi que le vaccin commercial Fel-O-Vac MC-K® (Fort Dodge), ce qui tend à montrer que la seule réponse en anticorps contre *M. canis* ne suffit pas à protéger les chats contre une infection ultérieure.



## **Chapitre 2**

### **Objectif et plan**

# **1. OBJECTIF GENERAL**

Ce travail s'inscrit dans le cadre de l'étude fonctionnelle des protéases sécrétées par *M. canis*. En effet, celles-ci interviennent potentiellement dans plusieurs aspects de la relation hôte-champignon, à savoir la dégradation des tissus kératinisés, l'induction et la modulation de la réponse immune, et l'adhérence aux tissus hôtes. Déterminer leurs rôles respectifs dans le processus infectieux a pour principale finalité l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et de candidats vaccinaux.

## **2. PLAN**

### **2.1. ETUDE 1**

La métalloprotéase MEP3, une endoprotéase hautement kératinolytique et sécrétée de façon majoritaire dans un milieu à base de poils de chat (Brouta *et al.*, 2001), s'est également révélée être immunogène, tant du point de vue de la réponse humorale que du point de vue de la réponse lymphoproliférative (Brouta *et al.*, 2003). Cette première étude s'attachera à évaluer le pouvoir protecteur chez le cobaye d'un vaccin anti-*M. canis* à base de MEP3 sous forme recombinante, tout en mesurant les réponses humorale et lymphoproliférative induites par la vaccination.

### **2.2. ETUDE 2**

L'essai de vaccination avec MEP3 n'a pas permis d'obtenir une protection contre l'infection. C'est également le cas d'un essai réalisé en parallèle avec SUB3 (Descamps *et al.*, 2003b), une autre protéase sécrétée et fortement kératinolytique (Mignon *et al.*, 1998a). Ces échecs ont fait apparaître la nécessité d'identifier chez *M. canis* de nouveaux immunogènes potentiels. Or, les DPP produites par divers organismes montrent des propriétés laissant supposer qu'elles pourraient jouer un rôle non seulement dans l'induction d'une réponse immune, mais aussi dans d'autres aspects de la pathogenèse de l'infection par *M. canis*. C'est pourquoi nous avons entrepris leur caractérisation, à la fois sur les plans moléculaire, enzymatique et fonctionnel.

### **2.3. ETUDE 3**

Les facteurs potentiels de virulence étudiés jusqu'ici, y compris les SUB, les MEP et les DPP caractérisées au cours de l'étude 2, n'auront de fonction définitivement prouvée en

tant que facteurs de virulence que si des souches fongiques déficientes, ayant perdu cette fonction, sont évaluées quant à leur pathogénicité. Les techniques traditionnelles d'interruption et de remplacement génique par recombinaison homologue étant difficiles à mettre en œuvre chez les champignons filamenteux (Weld *et al.*, 2006 ; Nakayashiki *et al.*, 2005), y compris les dermatophytes (Yamada *et al.*, 2006), une technique d'inhibition génique via l'ARN a été mise au point et évaluée chez *M. canis*. Les gènes cibles choisis pour sa mise en œuvre sont *SUB3* et *DPPIV*, l'un des deux gènes identifiés lors de l'étude précédente.

## **Chapitre 3**

### **Présentation systématique des recherches**

**ETUDE 1 : ESSAI DE VACCINATION DU COBAYE CONTRE LA  
DERMATOPHYTOSE A *M. CANIS* AU MOYEN D'UNE  
METALLOPROTEASE KERATINOLYTIQUE RECOMBINANTE DE  
43,5 kDa (MEP3)**

# **EVALUATION OF IMMUNOGENICITY AND PROTECTIVE EFFICACY OF A *MICROSPORUM CANIS* METALLOPROTEASE SUBUNIT VACCINE IN GUINEA PIGS**

Sandy M. Vermout<sup>1</sup>, Frédéric D. Brouta<sup>2</sup>, Frédéric F. Descamps<sup>3</sup>,  
Losson<sup>1</sup>, and Bernard R. Mignon<sup>1</sup>

Bertrand J.

<sup>1</sup>Department of Infectious & Parasitic Diseases, Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium

<sup>2</sup>UCB, Braine-l'Alleud, Belgium

<sup>3</sup>Agence Fédérale des Médicaments et des Produits de la Santé, Bruxelles, Belgium

## **ABSTRACT**

In order to identify protective immunogens against *Microsporium canis* infection, a purified recombinant keratinolytic metalloprotease (r-MEP3) was tested as a subunit vaccine in experimentally infected guinea pigs. Both humoral and cellular specific immune responses developed towards r-MEP3 were evaluated, by ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) and by *in vitro* lymphocyte transformation tests respectively. Vaccination induced a strong antibody response, and a significant but transient lymphoproliferative response against the protein. However, the protocol failed to prevent fungal invasion or development of dermatophytic lesions. These results show that under the present experimental conditions, r-MEP3 specific antibodies are not protective against a challenge exposure. They also suggest that in the same model, the induction of a cell-mediated immunity towards r-MEP3 is not sufficient, indicating the need for further research in the field of specific immune mechanisms involved in *M. canis* dermatophytosis.

Keywords : dermatophyte, dermatophyte vaccine, *Microsporium canis*, metalloprotease

## INTRODUCTION

Infections with the dermatophytic fungus *Microsporum canis* frequently occur in several domestic animals, especially the cat. Feline ringworm represents an important problem in animal husbandry, chronically or asymptotically infected individuals making it particularly difficult to eradicate. Furthermore, it is readily transmissible to humans and causes a zoonosis which is on the rise in many European countries [1]. It would therefore be helpful to develop an effective vaccine to protect cats against the infection.

Immunoprophylaxis has proved to be a valuable mean to control different types of dermatophytosis. The greatest success was obtained in cattle, using an attenuated strain of *Trichophyton verrucosum* (LTF 130) ; large-scale vaccination programs carried out in eastern Europe and Scandinavia in the past 30 years have dramatically reduced the prevalence of bovine ringworm and the incidence of human infections [2]. Other live vaccines, aimed at the protection of cattle against *T. verrucosum* and of fur-bearing animals against *T. mentagrophytes* [3-5], were also used successfully. Additionally, vaccination of calves with a ribosomal fraction of *T. verrucosum* significantly reduced the duration of the disease [6]. In guinea pigs, *M. canis* vaccination trials gave encouraging results. Indeed, a ribosomal fraction of the fungus, a multivalent and a monovalent inactivated vaccine, showed partial efficacy [7-9]. In addition, a recently developed combined live-inactivated vaccine containing *Trichophyton* spp. and *Microsporum* spp. obviated *M. canis* infection in farmed foxes [10]. In cats, the efficacy of a *M. canis* cell wall vaccine was evaluated in kittens challenged either by inoculation [11] or by contact with infected animals [12]. All vaccinated individuals developed dermatophytic lesions. Similar results were obtained when testing a combined live-inactivated multivalent vaccine [13]. An inactivated *M. canis* vaccine (Fel-O-Vax® MC-K, Fort Dodge), which is marketed in the United States for both prevention and treatment of feline ringworm, seems to have poor efficacy [13]. Few data are available about a commercial multivalent vaccine (Insol® Dermatophyton, Boehringer) containing eight dermatophyte strains including *M. canis* and *T. verrucosum*, so that its protective and therapeutic properties cannot be properly evaluated at that time [14].

Thus, to date, all the attempts to vaccinate cats against *M. canis* ringworm have been unfruitfull, while those made in guinea pigs proved only partially effective. In all these trials, uncharacterized or poorly characterized immunogens were used. The development of a subunit vaccine, with clearly defined composition and immunologic properties, and affording a high safety degree, must therefore be considered. In this context, a *M. canis* 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease (MEP3) was recently purified and characterized [15]. It is thought to be an

important virulence factor, since it is inducible *in vitro* by keratin [15], and is expressed *in vivo* during hair invasion [16]. Moreover, both antibody and cell-mediated immune responses towards recombinant MEP3 (r-MEP3) [17] were shown to be induced by cutaneous experimental infection in guinea pigs.

The aim of the present study was to evaluate the protective properties of the *M. canis* recombinant metalloprotease r-MEP3, used as a subunit vaccine in guinea pigs, in correlation with both antibody and cellular immune responses induced by the vaccine.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Animals**

Sixteen dermatophyte free 3 month-old female guinea pigs of the Hartley strain (B & K Universal Limited, Humberside, England) were used. Control and vaccinated animals were housed in separate cages, each of them containing a maximum of 2 guinea pigs.

### **Fungal strain and growth conditions**

*Microsporium canis* strain IHEM 15221 (Brussels, Belgium), previously isolated from a Wood-positive dermatophytic cat, was grown for 10 days at 27°C on Sabouraud agar, and used for the experimental infection.

### **Vaccine preparation**

The recombinant 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease (r-MEP3) was purified by cation-exchange chromatography from the supernatant of a transformed *Pichia pastoris* colony [17], and was dialyzed against 0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4). A single dose of vaccine contained 500 µl of a 200 µg ml<sup>-1</sup> purified metalloprotease solution, and 250 µl of Freund's complete or incomplete adjuvant for the first and the two subsequent immunizations respectively. Protein concentration was determined by the method of Bradford [18].



## **Experimental vaccination, challenge infection and blood sampling**

Guinea pigs were divided into 3 groups. Group 1 contained 6 animals vaccinated with r-MEP3. Group 2 contained 6 control guinea pigs injected with the adjuvant diluted in PBS only, whereas group 3 contained 4 non vaccinated, non infected control animals. Subcutaneous vaccination was performed 3 times at 2-week intervals (on study day number -76, -62 and -48). For each immunization the vaccine was divided in three equal parts which were injected into three different body sites. The allocation of experiment animals was randomized.

Seven weeks after the last vaccination (study day number 0), group 1 and 2 guinea pigs were infected with *M. canis*, essentially as described by Van Cutsem [19]. Briefly, the inoculum consisting in mycelia and spores collected from cultures on Sabouraud agar slopes was suspended in a honey-water (1/2 [vol/vol]) mixture and applied on a 15 cm<sup>2</sup>-back skin surface previously clipped and scarified. Each guinea pig was inoculated with  $2 \times 10^5$  colony forming units (CFU).

Negative controls from group 3 were exposed to the same procedure except that the inoculum did not contain any fungus. Blood samples were collected on days -76 and -62 and from day 0 to day 56 post-infection (PI) at two weeks intervals by intracardiac puncture performed under general anesthesia. Animal experiments were approved by the local ethic committee (University of Liège).

## **Clinical and mycological follow-up**

Animal infection was monitored weekly using clinical and mycological criteria. Clinical criteria were erythema, alopecia, squamosis and crusts. For each clinical criterion, a subjective score of zero, one or two was attributed by a single examiner throughout the experiment. This investigator was not aware of the guinea pig status (vaccinated or not). Mycological criteria were the presence of fluorescent hair under Wood's light and the growth of *M. canis* on Sabouraud plates (containing cycloheximide and chloramphenicol) after inoculation of hair collected by the hair-coat toothbrushing method [20]. A score of zero, one or two was attributed to each mycological criterion. A global score ranging from 0 to 12 was calculated by adding both clinical and mycological scores. A median global score was then calculated for each group of animals.

## ELISA

Serum samples were stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until use and all assays were performed in one batch at the end of the study period. Recombinant MEP3, reference antisera and rabbit anti-guinea pig Igs (Dako, Glostrup, Denmark) were appropriately diluted after standard checkerboard titration (data not shown). All washes were repeated four times. Polystyrene microtiter plates (Maxisorp F16, Nunc, Roskilde, Denmark) were coated for one hour at  $37^{\circ}\text{C}$  with  $100\ \mu\text{l}$  per well of a  $20\ \mu\text{g ml}^{-1}$  r-MEP3 solution in PBS. Odd rows were sensitized with the antigen while even ones remained free of antigen as control wells. After washing with PBS, plates were saturated for one hour at  $37^{\circ}\text{C}$  with saturation buffer (PBS containing 1% [wt/vol] bovine serum albumine [BSA; Sigma, Munich, Germany]) and then washed with PBS containing 0.05% [vol/vol] Tween 20 (PBS-T). Serum samples were diluted 1:100 in dilution buffer (saturation buffer containing 0.05% [vol/vol] Tween 20). One hundred  $\mu\text{l}$  serum samples were added for one hour at  $37^{\circ}\text{C}$  to two antigen-coated and two control wells. After washing with PBS-T,  $100\ \mu\text{l}$  of horse raddish peroxidase-conjugated rabbit anti-guinea pig Igs diluted 1:20,000 in dilution buffer were added for one hour at  $37^{\circ}\text{C}$ . The plates were washed with PBS-T and peroxidase activity was then revealed by the addition of  $100\ \mu\text{l}$  of a solution containing tetramethylbenzidin and hydrogen peroxide (Coris BioConcept, Namur, Belgium). The reaction was stopped after 7 min at room temperature with  $50\ \mu\text{l}$  of 1 M sulphuric acid, and the absorbance at 450 nm was immediately measured with a spectrophotometer (Multiskan RC, Thermolabsystems, Helsinki, Finland). On each plate, positive and negative reference antisera were also included in duplicates. The positive reference antiserum was collected by Mignon *et al.* [21] from a guinea pig immunized with a crude exo-antigen containing MEP3. The negative reference antiserum was a pool of the sera obtained on day 56 PI from the guinea pigs of group 3.

For each serum tested, the optical density (OD) was defined as the mean of the absorbance differences between control and antigen-sensitized wells. Results were then expressed as OD percentages obtained as follows:  $\text{OD percentage} = (\text{OD}_x - \text{OD}_n) / (\text{OD}_p - \text{OD}_n)$  where  $\text{OD}_x$  is the OD obtained with the tested serum,  $\text{OD}_p$  and  $\text{OD}_n$  are the OD obtained on the same plate with the positive and the negative reference antisera respectively. Mean OD% was calculated for each group.

## Lymphocyte blastogenesis test

Cell-mediated immunity (CMI) to r-MEP3 was evaluated *in vitro* by the lymphocyte blastogenesis test (LBT). For this experiment, animals from groups 1 and 2 were randomly divided into 2 subgroups of 3 guinea pigs each. Two ml of heparinized blood were sampled from each guinea pig and diluted 1:2 in PBS. Samples from guinea pigs belonging to the same subgroup were then mixed together, pipetted over 9 ml of Ficoll-Paque solution (Amersham, Uppsala, Sweden) in 50-ml conical tubes and centrifuged for 30 min at 400 g. The peripheral blood mononuclear cell (PBMC) rings were harvested and washed twice in PBS for 10 min at 400 g. PBMC were then diluted at a final concentration of  $1 \times 10^6 \text{ ml}^{-1}$  in RPMI-1640 medium (Bio Media, Boussens, Belgium) containing 2% horse serum (Gibco Brl, Paisley, UK), 1% non essential amino acids, 1% sodium pyruvate, 10 IU  $\text{ml}^{-1}$  penicillin, 0.1  $\text{mg ml}^{-1}$  streptomycin and 50  $\mu\text{M}$  2-mercaptoethanol. Aliquots of the cell suspension (250  $\mu\text{l}$ ) were incubated in 96-well sterile tissue-culture plates (Corning, NY, USA) containing in quadruplicates either PBS (negative control wells), 1  $\mu\text{g}$  concanavalin A (positive control wells) or 500 ng heat-inactivated r-MEP3 (test wells). Plates were cultured for 3 days at 37°C in an atmosphere containing 5%  $\text{CO}_2$  and pulsed with 1  $\mu\text{Ci}$  of [ $^3\text{H}$ ] thymidine (Amersham) for 24 h. Cells were harvested onto glass fibre filters (Skatron, Sterling, VA, USA) using a Skatron cell harvester. The dried filter discs were transferred to vials containing 4 ml of scintillation fluid (Ecoscint A, National Diagnostics, Hesse Hull, UK), and incorporation of [ $^3\text{H}$ ] thymidine was quantified for 3 min with a Beckman LS 5000 CE scintillation counter (Beckman Instruments, Fullerton, CA). The results of the LBTs were expressed as a stimulation index (SI), calculated as the ratio of the mean count per minute (cpm) in the test wells divided by the mean cpm in the negative control wells.

## Statistics

The Mann-Whitney U-test was used for the statistical comparison of both median global scores and ELISA results between the vaccinated and the non-vaccinated groups. This test was performed with the software Statistica. A P value of  $< 0.01$  was considered significant. The necessity of pooling the PBMC samples did not allow performing statistical tests on LBT results.

## RESULTS

In the conditions of the study, and despite the induction of a significant humoral and cellular immune response, vaccination with r-MEP3 did not allow any reduction of lesion intensity, of disease duration, or of fungal invasion.

**Clinical and mycological follow-up.** All guinea pigs from challenged group developed clinical signs consistent with dermatophytosis, although considerable variation in lesion intensity was observed between animals. Non infected animals from group 3 did not develop any dermatophytic lesion. Typical dermatophytic signs were already observed on day 7 PI. All the challenged animals were found to be culture positive on the first sampling (day 14 PI) and Wood positive on day 21 PI or sooner, except one animal from group 1 and one from group 2 which remained Wood negative. Median global scores, accounting for both clinical and mycological evaluations, are shown in figure 1. In the two challenged groups, highest scores were observed between day 14 to 28 PI and then lesions resolved progressively.

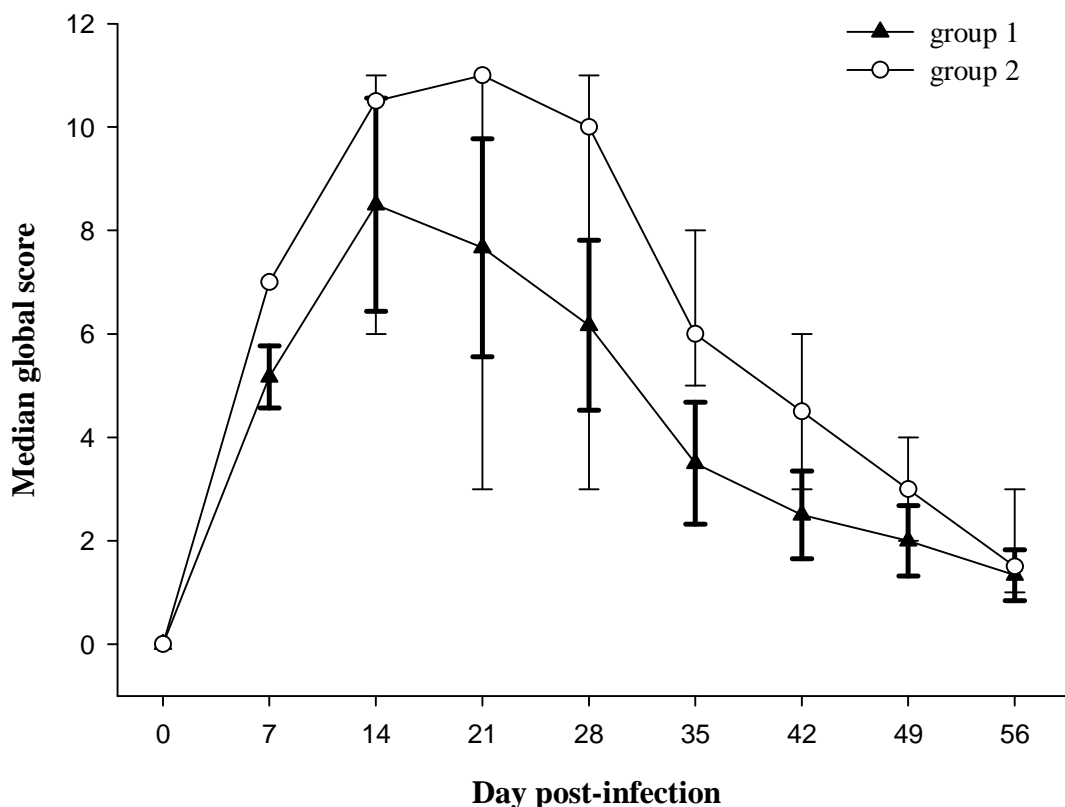


fig. 1 : Evolution of median global scores (+ / - 75th / 25th percentile) in vaccinated (group 1) and non vaccinated (group 2) guinea pigs on the basis of clinical and mycological criteria

**Antibody response.** Vaccinated animals from group 1 developed a very high and significant antibody response towards r-MEP3 (figure 2). Maximal response was observed on day 0, i.e. 7 weeks after the last immunization. The antibody titres remained high until the end of the experiment and were significantly higher than those observed in the group of non vaccinated control animals (group 2) during all the infection period (P ranging from 0.004 to 0.01) except on day 56 PI (P=0.08). Antibody titres recorded in group 3 (non infected control animals) remained at a basal level during the whole experiment (data not shown).

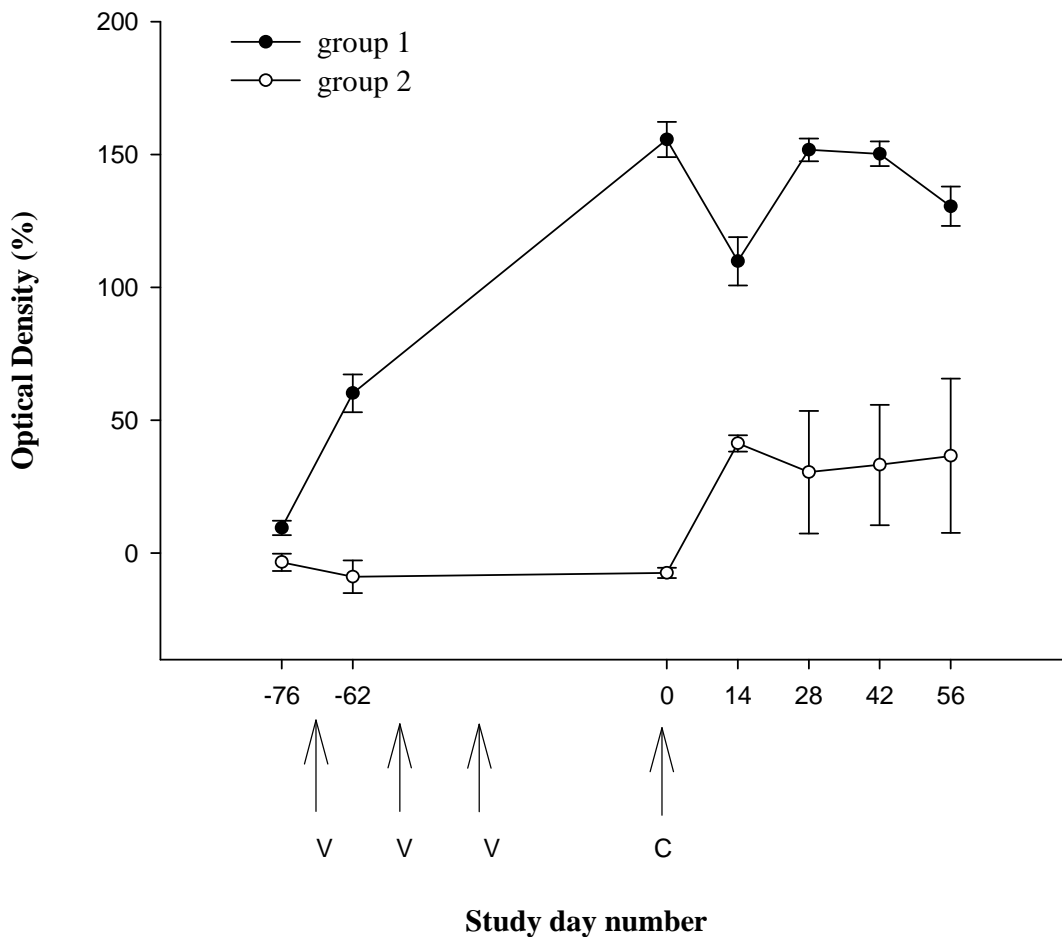


fig. 2 : Kinetics of the mean antibody response (optical density + / - standard error of the mean) to r-MEP3 in vaccinated (group 1) and control (group 2) guinea pigs. V: vaccination ; C: challenge infection

**CMI responses.** Vaccination with r-MEP3 induced a strong but transient lymphoproliferative immune response (figure 3). The mean SI obtained with r-MEP3-

stimulated lymphocytes increased notably in group 1 after the first immunization, to reach 8.2 on day -62. The SI dramatically decreased 7 weeks after the last immunization, which corresponded with the infection challenge day, and was similar to SI observed in control group 2. SI increased after challenge exposure, albeit irregularly, in both vaccinated and control guinea pigs. In non infected animals from group 3, SI remained at a basal level (<1.5) throughout the experiment (data not shown). Considerable variations were observed in a given group depending of the subgroup.

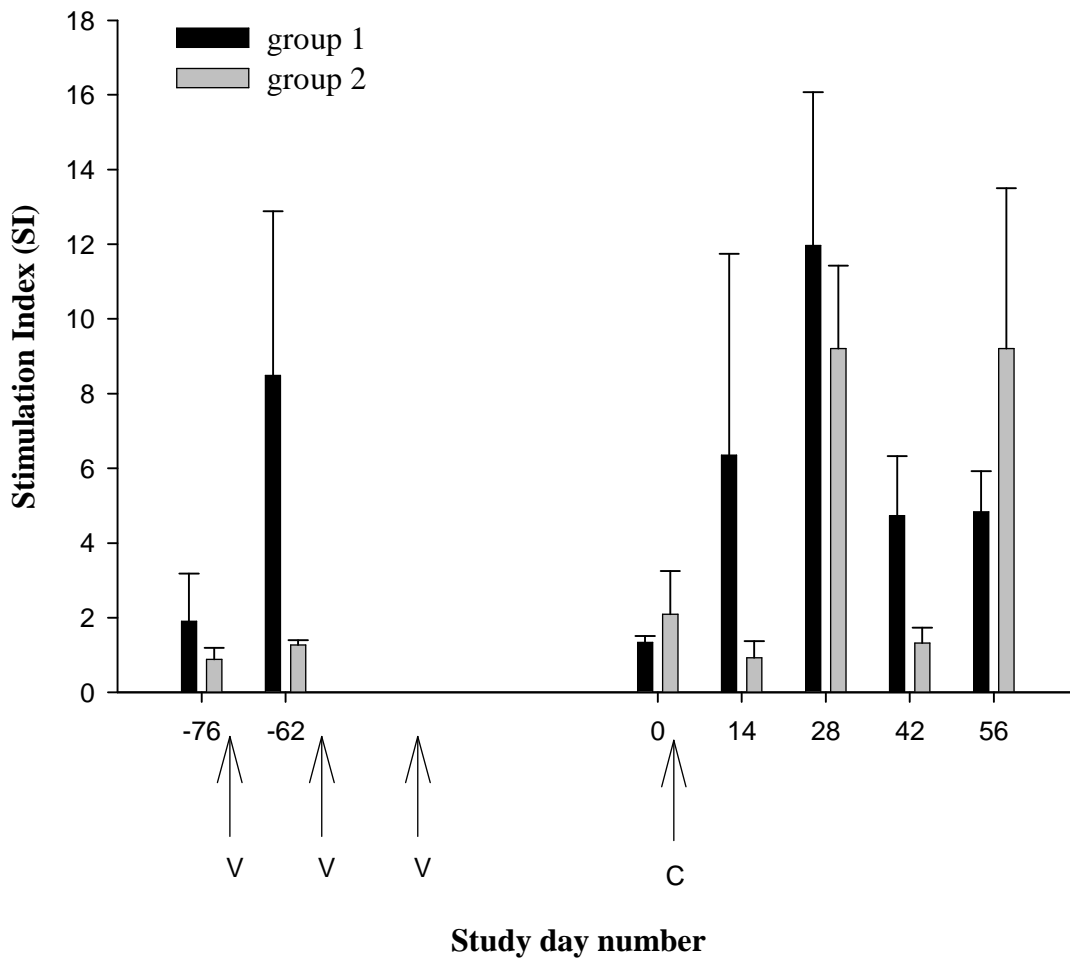


fig. 3 : Lymphoproliferative response (mean Stimulation Index (SI) + / - standard error of the mean) to r-MEP3 in vaccinated (group 1) and control (group 2) guinea pigs. V : vaccination ; C : challenge infection

## DISCUSSION

Vaccination with r-MEP3 induced high antibody titers, and primed cell-mediated immunity ; nevertheless, it didn't confer protection. This result could have been influenced either by the properties of the immunogen itself, or by the vaccination protocol, including the

adjuvant. In addition, the challenge infection to which guinea pigs were subjected might be too vigorous to be eliminated by the immune response induced by the vaccine. Indeed, it has been shown that anti-dermatophytic immunity is relative and can be overcome by sufficient doses of infecting spores [22].

Although specific antibodies are effectively produced in *M. canis* [23,24] and other dermatophytic infections, no correlation has been observed between antibody titers and recovery from the disease. This apparent unimportant role of humoral immunity in the elimination of dermatophytic and other fungal infections can be explained by the coexistence of protective and useless or even blocking antibodies in polyclonal immune sera [25-27]. Protective antibodies probably act by enhancing innate immunity, for example by promoting phagocytosis [26]. Similarly, the strong antibody response induced by r-MEP3 vaccine could be irrelevant or even detrimental with regard to protection. In this regard, it would be relevant to test the inhibiting properties of specific antibodies on the keratinolytic activity of the enzyme. Furthermore, the production of some Ig subclasses seems to be prejudicial to the development of protective immunity. Indeed, high titers of specific antibodies of the IgE subclass were associated with chronic or recurrent dermatophytosis and with a poor cellular immune response [28]. It would therefore be of interest to determine specific IgE titres induced by candidate vaccines, as production of IgE was shown to be markedly influenced by the dose of immunogen [29].

The induction of a cell-mediated immune response is considered to be of paramount importance for the elimination of a dermatophytic infection as well as several other fungal diseases. Lymphocyte transfer from infected to naive mice was protective against *T. quinckeanum* infection, whereas serum transfer was not [30]. In cats [23, 31-33] as well as in humans [34,35], specific lymphocyte blastogenesis and Delayed Type Hypersensitivity (DTH) reactivity at skin testing are associated with recovery of dermatophytic disease and with subsequent protection. Furthermore, DTH reactions and cytokine profiles observed in humans indicate that protective immune response is of the Th1-type [36,37]. In agreement with these observations is the fact that neither of the vaccines tested in cats was able to induce a significant cell-mediated response, while specific antibody titers increased markedly with all vaccination protocols tested [11-13]. In contrast, partial success in guinea pigs were associated with the stimulation of cellular immunity [7-9]. In our study, the significant lymphoproliferative response induced by vaccination showed that r-MEP3 is able to stimulate cell-mediated immunity. Nevertheless, this response had returned to a low level at the moment of challenge. These results suggest that cellular immune response induced by the vaccine was short lived and

could have been insufficient to protect guinea pigs against challenge. However, the reactivity of peripheral blood T helper cells was assessed only. In order to specify the precise type of cell-mediated response induced by the vaccine, it would be relevant to determine which cytokine profiles are elicited by reacting lymphocytes, and which cell types are locally attracted after challenge infection.

The choice of r-MEP3 as a vaccine candidate was namely based on the immunogenic character of MEP3 [17]. However, it was previously shown that r-MEP3 was markedly glycosylated, whereas native protease was not (Brouta, personal communication). Sugar moieties beared by r-MEP3 could influence the immune response induced by the vaccine, by impeding antigen processing, shielding epitopes, or on the contrary creating novel and irrelevant antigenic determinants [38]. Finally, a high immunogenicity is not systematically associated with protective ability, and can even enhance subsequent infection. Such observations were made for instance by Bromuro *et al.* [39], who used a 70 kDa HSP (Heat Shock Protein) from *Candida albicans* as a vaccine immunogen in a mouse model.

The apparent lack of protective properties of r-MEP3 should be interpreted with caution; indeed, it is also possible that the vaccination protocol used was not optimal. Namely, the effect of the adjuvant plays an essential role. Freund's Complete Adjuvant is known to stimulate strong cell-mediated responses; however, it equally induces high antibody titers, and it was shown to generate a non-polarized cytokine profile with at least some immunogens [40]. That is in accordance with the strong humoral response observed in this study. Consequently, it would be judicious to test new generation adjuvants that stimulate Th1 responses in a specific manner [41].

It comes out from this study that the development of an effective subunit vaccine against *M. canis* infection will probably not be feasible without a thorough knowledge of the intricate immunologic mechanisms that lead to protection. Major immunogens, as well as cells and mediators involved in protective response, should be further investigated. This would allow a rational choice of the adequate antigens or epitopes, and of the optimal vaccination protocol, including the adjuvant preparation.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Jacques Detry and Françoise Maréchal for their excellent technical assistance.

This work was supported by grant n° 3.4534.01 from Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (FRSM). Sandy Vermout and Frédéric Descamps are recipients of a



studentship of F.R.I.A. (Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture, rue d'Egmont 5, 1000 Bruxelles).

## REFERENCES

1. Lunder, M. and Lunder, M. (1992) Is *Microsporium canis* infection about to become a serious dermatological problem? *Dermatology* 184, 87-89.
2. Gudding, R. and Lund, A. (1995) Immunoprophylaxis of bovine dermatophytosis. *Can. Vet. J.* 36, 302-306.
3. Rybnikar, A., Chumela, J. and Vrzal, V. (1991) Prophylactic and therapeutic use of a vaccine against trichophytosis in a large herd of silver foxes and arctic foxes. *Acta Vet. Brno* 60, 285-288.
4. Gordon, P.J. and Bond, R. (1996) Efficacy of a live attenuated *Trichophyton verrucosum* vaccine for control of bovine dermatophytosis. *Vet. Rec.* 139, 395-396.
5. Bratberg, A.M., Solbakk, I.T., Gyllensvaan, C., *et al.* (1999) Efficacy of an inactivated and a live bovine ringworm vaccine in an experimental challenge study (abstr), in *Proceedings Annu. Meet. Am. Acad. Vet. Dermatol.* 15, 113-114.
6. Elad, D. and Segal, E. (1995) Immunogenicity in calves of a crude ribosomal fraction of *Trichophyton verrucosum*: a field trial. *Vaccine* 13, 83-87.
7. Elad, D. and Segal, E. (1994) Immunogenicity in guinea pigs of a crude ribosomal fraction from *Microsporium canis*. *Vaccine* 12, 134-138.
8. Pier, A.C., Hodges, A.B., Lauze, J.M. and Raisbeck, M. (1995) Experimental immunity to *Microsporium canis* and cross reactions with other dermatophytes of veterinary importance. *J. Med. Vet. Mycol.* 33, 93-97.
9. Wawrzkiwicz, K. and Ziolkowska, G. (1996) Specific immunoprophylaxis in *Microsporium canis* infection in guinea pigs. *J. Mycol. Méd.* 6, 56-62.
10. Bredahl, L.K., Bratberg, A.M., Solbakk, I.T., *et al.* (2000) Efficacy of an experimental *Microsporium canis* vaccine in farmed foxes (abstr). *Vet. Dermatol.* 11 (suppl 1), 39.
11. Deboer, D.J. and Moriello, K.A. (1994) The immune response to *Microsporium canis* induced by a fungal cell wall vaccine. *Vet. Dermatol.* 5, 47-55.
12. Deboer, D.J. and Moriello, K.A. (1995) Investigations of a killed dermatophyte cell wall vaccine against infection with *Microsporium canis* in cats. *Res. Vet. Sci.* 59, 110-113.
13. Deboer, D.J., Moriello, K.A., Blum, J.L., Volk, L.M. and Bredahl, L.K. (2000) Safety and immunologic effects after inoculation of inactivated and combined live-inactivated

- dermatophytosis vaccines in cats. *Am. J. Vet. Res.* 63, 1532-1537.
14. Fenner, A., and Karle, J. (2000) Therapeutic vaccination against dermatophytosis in horses with Insol ® Dermatophyton – results of a field-study in eleven German counties. *Prakt. Tierarzt.* 81, 574-578.
  15. Brouta, F., Descamps, F., Fett, T., Losson, B., Gerday, C. and Mignon, B. (2001) Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. *Med. Mycol.* 39, 269-275.
  16. Brouta, F., Descamps, F., Monod, M., Vermout, S., Losson, B. and Mignon, B. (2002) Secreted metalloprotease gene family of *Microsporum canis*. *Infect. Immun.* 70, 5676-5683.
  17. Brouta, F., Descamps, F., Monod, M., Vermout, S., Losson, B. and Mignon, B. Humoral and cell-mediated response to a recombinant keratinolytic metalloprotease (r-MEP3) from *Microsporum canis* in experimentally infected guinea pigs. *Med. Mycol.* In press.
  18. Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
  19. Van Cutsem, J. (1989) Animal models for dermatomycotic infections. In: *Current topics in Medical Mycology* (McGinnis, M. R., Borgers, M., Eds), Vol. 3, pp. 1-35. Springer-Verlag, New York.
  20. Mignon, B. and Losson, B. (1997) Prevalence and characterization of *Microsporum canis* carriage in cats. *J. Med. Vet. Mycol.* 35, 249-256.
  21. Mignon, B., Leclipteux, T., Focant, C., Nikkels, A., Piérard, G. and Losson, B. (1999) Humoral and cellular immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporum canis* in experimentally infected guinea pigs. *Med. Mycol.* 37, 123-129.
  22. Jones, H. E., Reinhardt, J.H., and Rinaldi, M.G. (1974) Acquired immunity to dermatophytes. *Arch. Dermatol.* 109, 840-848.
  23. Deboer, D.J. and Moriello, K.A. (1993) Humoral and cellular immune responses to *Microsporum canis* in naturally occurring feline dermatophytosis. *J. Med. Vet. Mycol.* 31, 121-132.
  24. Sparkes, A.H., Stokes, C.R. and Gruffydd-Jones, T.J. (1993) Humoral immune responses in cats with dermatophytosis. *Am. J. Vet. Res.* 54, 1869-1873.
  25. Casadevall, A. (1995) Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect. Immun.* 63, 4211-4218.
  26. Casadevall, A., Feldmesser, M., and Pirofski, L. (2002) Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Curr. Opin. Microbiol.* 5, 386-391.
  27. Bromuro, C., Torosantucci, A., Chiani, P., Conti, S., Polonelli, L. and 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.
28. Woodfolk, J.A., Slunt, J.B., Deuell, B., Hayden, M.L. and Platts-Mills, T.A. (1996) Definition of a *Trichophyton* protein associated with delayed hypersensitivity in humans. Evidence for immediate (IgE and IgG4) and delayed hypersensitivity to a single protein. *J. Immunol.* 156, 1695-1701.
  29. Sudowe, S., Arps, V., Vogel, T. and Kolsch, E. (2000) The role of interleukin-4 in the regulation of sequential isotype switch from immunoglobulin G1 to immunoglobulin E antibody production. *Scand. J. Immunol.* 51, 461-471.
  30. Calderon, R.A. and Hay, R.J. (1984) Cell-mediated immunity in experimental murine dermatophytosis II. Adoptive transfer of immunity to dermatophyte infection by lymphoid cells from donors with acute or chronic infections. *Immunology* 53, 465-472.
  31. Deboer, D.J., Moriello, K.A., Cooley, A.J. (1991) Immunological reactivity to intradermal dermatophyte antigens in cats with dermatophytoses. *Vet. Dermatol.* 2, 59-67.
  32. Sparkes, A.H., Stokes, C.R., Gruffydd-Jones, T.J. (1995) Experimental *Microsporium canis* infection in cats: correlation between immunological and clinical observations. *J. Med. Vet. Mycol.* 33, 177-184.
  33. Sparkes, A.H., Gruffydd-Jones, T.J., and Stokes, C.R. (1996) Acquired immunity in experimental feline *Microsporium canis* infection. *Res. Vet. Sci.* 61, 165-168.
  34. Kerbs, S., Greenberg, J. and Jesrani, K. (1977) Temporal correlation of lymphocyte blastogenesis, skin test responses, and erythema during dermatophyte infections. *Clin. Exp. Immunol.* 27, 526-530.
  35. Hay, R.J. (1997) Fungal Infections. In : *Fungal Disease. Biology, Immunology and Diagnosis* (Jacobs, P.H., Nall, L., Eds.), pp.209-218. Marcel Dekker, New York.
  36. Ogawa, H., Summerbell, R.C., Clemons, K.V., Koga, T., Ran, Y.P., Rashid, A., Sohnle P.G., Stevens D.A., and Tsuboi R. (1998) Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. *Med. Mycol.* 36 (suppl 1), 166-173.
  37. Slunt, J.B., Taketomi, E.A., Woodfolk, J.A., Hayden M.L., and Platts-Mills, T.A. (1996) The immune response to *Trichophyton tonsurans* : distinct T cell cytokine profiles to a single protein among subjects with immediate and delayed hypersensitivity. *J. Immunol.* 157, 5192-5197.
  38. Rudd, P.M., Elliott, T., Cresswell, P., Wilson, I.A. and Dwek R.A. (2001) Glycosylation and the immune system. *Science* 291, 2370-2376.

39. Bromuro, C., La Valle, R. and Sandini, S. (1998) A 70-kilodalton recombinant Heat Shock protein of *Candida albicans* is highly immunogenic and enhances systemic murine candidiasis. *Infect. Immun.* 66, 2154-2162.
40. Comoy, E.E., Capron, A., Typhronitis, G. (1997) *In vivo* induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens. *Int. Immunol.* 9, 523-531.
41. Moingeon, P., Haensler, J., and Lindberg, A. (2001) Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine* 19, 4363-4372.

**ETUDE 2 : ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES GENES DE  
DIPEPTIDYL PEPTIDASES DE *MICROSPORUM CANIS* ; ETUDE DE LEUR  
EXPRESSION *IN VIVO* ET *IN VITRO*. PRODUCTION DES PROTEASES SOUS  
FORME RECOMBINANTE, ET ETUDE DE LA REPONSE IMMUNE CELLULAIRE  
CUTANEE ENVERS LA DIPEPTIDYL PEPTIDASE V DE *M. CANIS***

**Secreted dipeptidyl peptidases as potential virulence factors  
for *Microsporium canis***

Sandy Vermout, Aline Baldo, Jérémy Tabart, Bertrand Losson and Bernard Mignon

Department of Infectious & Parasitic Diseases, Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège,  
Liège, Belgium

## Summary

Dermatophytoses caused by *Microsporum canis* are frequently encountered in cats and dogs; they are highly contagious and readily transmissible to humans. Endoproteases secreted by this fungus were shown to play an essential role in the digestion of keratinized structures, whereas no exoproteases were characterized to date in this species. In this study, two unique genes respectively coding for dipeptidyl peptidases IV and V (DPPIV and DPPV), were isolated and characterized. Both proteins share homology with serine proteases of the S9 family, some of which displaying properties compatible with implication in pathogenic processes. Both genes are expressed *in vivo* in experimentally infected guinea pig and in naturally infected cat, and their expression is greatly increased when the fungus is grown on extracellular matrix proteins as the sole nitrogen and carbon source. DPPIV and V were produced as active recombinant proteases in the yeast *Pichia pastoris*. The apparent molecular weight of rDPPV is 83 kDa, whereas rDPPIV appears as a doublet of 95 and 98 kDa. Like other members of its enzymatic subfamily, rDPPIV has the unusual ability to cleave Pro-X bonds. This activity doesn't enhance the solubilization of keratin by fungal secreted endoproteases, and the protease probably acts solely on small soluble peptides. RDPPV showed no ability to induce DTH skin reactions in guinea pigs, what is surprising given the known immunogenic properties of homologous proteins. In conclusion, *M. canis* DPPIV and V, which are potentially involved in keratinized substrate digestion as well as in direct host-pathogen interactions, have been characterized at the molecular level and produced as recombinant proteins; the latter could be valuable tools for further functional studies of the proteases.

## Introduction

*Microsporum canis* is responsible for superficial mycoses primarily affecting cats and dogs, but contagious to other animal species and to humans. As a dermatophyte, it exclusively invades keratinized tissues like *stratum corneum*, hair and nails, and rarely infects dermis and subcutaneous tissues. Like other fungi of this group, its ability to obtain nutrients from a complex and insoluble protein network is conferred by a collection of secreted proteases thought to act in cooperation to digest hard keratin into assimilable nutrients. Among these proteases are endoproteases, mainly represented by two families of 3 subtilases (SUB) and 5 metalloproteases (MEP), respectively from the S8 and M36 protease families (Brouta *et al.*, 2002; Descamps *et al.*, 2002), and which probably reflects the specialization of dermatophytes in the utilization of keratinized substrates (Jousson *et al.*, 2004a, b). Among them, *M. canis* SUB3 and MEP3 are expressed *in vivo* and proved to be highly keratinolytic (Mignon *et al.*, 1998a, b; Brouta *et al.*, 2001). Moreover, inhibition studies showed that each of the two dermatophytic enzyme families was responsible for approximately one half of the fungal secreted proteolytic activity (Mignon *et al.*, 1998b; Jousson *et al.*, 2004a).

Secreted exopeptidases were also identified in the dermatophyte *Trichophyton rubrum*, and characterized at the molecular level (Monod *et al.*, 2005). They comprise two leucine aminopeptidases (LAPs) from de M28 family and two dipeptidyl peptidases (DPPIV and DPPV) from the S9 family. These two types of enzymes were proposed to act synergistically in the trimming of peptides produced by endoproteases, thereby producing oligopeptides and free amino acids that could be taken up via membrane transporters (Monod *et al.*, 2005). Besides, in *Trichophyton tonsurans*, the DPPV orthologue was shown to be a key element in the induction of the relevant immune response, since it was associated with a DTH (delayed-type hypersensitivity) skin reaction and the production of Th1 cytokines in patients that had recovered from the infection, whereas chronically infected individuals developed IH (Immediate Hypersensitivity) skin reactions and a Th2 response towards the same protein (Woodfolk *et al.*, 1996, 1998; Slunt *et al.*, 1996). In the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*, DPPIV and V were suggested to play roles in both digestion of invaded tissues, and modulation or induction of the immune response (Kobayashi *et al.*, 1993; Beauvais *et al.*, 1997a, b; Latgé *et al.*, 1999; Hebart *et al.*, 2002). As members of the S9B subfamily, *A. fumigatus* and *T. rubrum* DPPIV share the peculiar ability to cleave Pro-X bonds, which are known to be particularly resistant to enzymatic hydrolysis. In view of the characteristics of other DPPs from pathogenic fungi, putative *M. canis* DPPs were considered as possible virulence factors, involved in the degradation of keratinized tissues, and in the induction of a



DTH immune response.

In this study, the genes of a DPPIV and a DPPV were isolated using heterologous probes from *T. rubrum* and characterized. Transcription of both DPP genes was detected *in vivo*, and both were shown to be strongly induced in culture media constituted of extracellular matrix proteins. Recombinant DPPIV and V were obtained in the yeast *Pichia pastoris* and proved to be prolyl- and alanyl dipeptidyl peptidases, respectively. Surprisingly, purified DPPV was not able to induce DTH skin reactions in experimentally infected guinea pigs.

## Materials and Methods

**Strains and plasmids.** *M. canis* IHEM 21239 was used for all experiments, except for gene isolation that was performed with *M. canis* IHEM 15221. *Escherichia coli* LE392 was used for the propagation of bacteriophage  $\lambda$ EMBL3 (Promega). All subcloning experiments were carried out using *E. coli* TOP10 (Invitrogen). Isolated gene fragments were cloned in plasmid pUC18 pre-digested with *Sma* I (Amersham). For the expression of recombinant proteases, *P. pastoris* KM71 was used in combination with the shuttle vector pPICZ $\alpha$ B (Invitrogen).

***M. canis* growth conditions.** *M. canis* was initially grown on Sab plates (Sabouraud's medium, 2% glucose, 1% peptone). To evaluate the induction of DPPs expression, plugs of growing mycelium from 7-day-old cultures were transferred in 2.5 ml of one of the five following complex protein media, all based on MM (Minimal Medium, 0.05% glucose, 0.005% inositol, 0.001% pyridoxine, 0.001% thiamine and 2mM MgSO<sub>4</sub>, in 28mM phosphate buffer pH 7.8): GM (Glucose Medium, MM + 0.25% glucose), FHM (Feline Hair Medium, MM + 0.5% feline hair) (Mignon *et al.*, 1998a, b), KM (Keratin Medium, MM + 0.25% powdered bovine keratin, ICN), CM (Collagen Medium, MM + 0.25% collagen, Sigma), EM (Elastin Medium, MM + 0.25% elastin, Sigma). The fungus was grown for 40 hours, at 28°C under agitation.

**Gene isolation and cloning.** Approximately  $2 \times 10^4$  recombinant plaques of a previously constructed *M. canis*  $\lambda$ EMBL3 genomic library (Brouta *et al.*, 2002; Descamps *et al.*, 2002) were immobilized on nylon membranes (GeneScreen, NEN Life Science Products). Filters were hybridized with two <sup>32</sup>P-labelled DNA probes under low-stringency conditions, as described earlier (Descamps *et al.*, 2002). The probes were obtained by standard PCR on *T. rubrum* cDNA (kindly provided by Prof. Michel Monod, Dermatology, CHUV Lausanne, Switzerland), using PCR Core System I kit (Promega). The first one consisted in a 1250 bp (base pair) fragment of

the *T. rubrum* DPPIV gene (GenBank accession no. AY497021), amplified with primers P1 and P2 described in table 1. The second one was a 1000 bp fragment of the *T. rubrum* DPPV gene (GenBank accession no. AF407232), amplified with primers P3 and P4 (Table 1). Random labeling of the probes was performed with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-dATP (Amersham Pharmacia Biotech) and the Prime-a-Gene Labeling System (Promega), following manufacturer's instructions. The membranes were exposed to an X-ray film, after two 15 min washes at 38°C in a washing solution bath (2 x standard sodium citrate, 1% sodium dodecyl sulphate). Positive plaques were picked and purified by a secondary screening. Bacteriophage DNAs were isolated using a kit (Lambda Mini Kit, Qiagen); enzyme-restricted DNAs were subjected to Southern blotting and hybridization, following standard procedures (Sambrook *et al.*, 1989). Hybridizing fragments were subcloned in plasmid pUC18 and sequenced (GIGA, Groupement Interfacultaire de Génomique Appliquée, University of Liège, Belgium). Homologous sequences identified by BLAST searches were compared with isolated gene sequences using MultAlin and GeneDoc softwares.

**Screening for paralogues.** *M. canis* genomic DNA was extracted following the method of Girardin and Latgé (1994). Enzyme-restricted DNA was subjected to Southern blotting and hybridized with two probes corresponding to the entire *DPPIV* and *DPPV* *M. canis* genes. These probes were amplified from bacteriophages containing the isolated genes, with primer pairs P5-P6 for the *DPPIV*-based probe, and P7-P8 for the *DPPV*-based probe (Table 1). The latter primers were designed on the basis of *T. rubrum* *DPPV* sequence.

**Experimental infection of guinea pigs.** Female specific pathogen-free guinea pigs of the Dunkin Hartley strain (B & K) were used for *M. canis* cutaneous infection, essentially as described by Van Cutsem (1989). Briefly, mycelium scraped from 8-day-old Sab plates and suspended in a honey:water (1:2 vol/vol) mixture was applied on a 16 cm<sup>2</sup> back skin surface previously clipped and scarified. Each guinea pig was infected with 10<sup>5</sup> CFU (Colony Forming Units). Non infected control guinea pigs were exposed to the same procedure, except that the honey:water mixture did not contain any fungus. For *in vivo* detection of DPPs expression, two 3-month-old guinea pigs were infected. For skin testing experiment, 15 one-year-old guinea pigs were used. Twelve of them had been infected nine months earlier for the needs of another experiment and were reinfected; three other ones were never infected. Animal experiments were approved by the local ethic committee (University of Liège).

***In vivo* detection of DPPs mRNAs by nested RT (Reverse Transcription)-PCR.** Infected hairs, fluorescent under Wood's lamp, were plucked from the two experimentally infected guinea pigs, and from one naturally infected adult cat of the European breed. Non infected hairs, collected in a distant body site with regard to the infected sites, served as negative controls. Hairs were ground under liquid nitrogen with a mortar and pestle, and RNA was extracted from hair lysate using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). On-column DNase digestion was performed with RNase-Free DNase Set (Qiagen). RNA was eluted in 60  $\mu$ l water, and 5  $\mu$ l of the obtained solution were used as template for RT-PCR (45 cycles) using Access RT-PCR System (Promega) and the primer pairs P9-P10 (DPPIV) or P11-P12 (DPPV) (Table 1). Reverse transcriptase was omitted in control reactions. The crude reaction product (5  $\mu$ l) was then used as template in a standard PCR (35 cycles), using the PCR Core System I kit (Promega), and internal primers P13-P14 (DPPIV) or P15-P16 (DPPV) (Table 1). Expected length of the amplicons was of 584 bp and 510 bp for DPPIV and DPPV, respectively.

**Evaluation of DPPs transcription levels on protein media by real time RT-PCR.** For the five tested media, mycelium from three culture replicates was harvested and ground under liquid nitrogen. RNA was extracted using InstaPure reagent (Eurogentec) and converted to cDNA with iScript cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad) after DNase treatment (RQ1 RNase free DNase, Promega). Real-time PCR reactions were assembled with qPCR Mastermix Plus for SYBR Green I kit (Eurogentec) and submitted to the following protocol in a iCycler (Bio-Rad): 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and 45 cycles of 15 sec at 95°C, 20 sec at 60°C, 40 sec at 72°C. *M. canis* actin was used as the normalizer gene. Primer pairs P17-P18, P19-P20 and P21-P22 were used for the detection of DPPIV, DPPV and actin, yielding amplicons of 118, 137 and 282 bp, respectively (Table 1). All assays were performed in duplicate. Specificity of each reaction was confirmed by agarose gel electrophoresis and by performing a melting curve. Results in terms of cycle thresholds were converted in folds actin expression using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, and then expressed as folds expression with regard to expression in GM. Method was validated by assaying serial dilutions of a series of samples.

**Production of recombinant DPPs in *P. pastoris* and purification of recombinant DPPV.** Complementary DNAs (cDNAs) of *DPPIV* and *V* were amplified with primer pairs P23- P24 (DPPIV) and P25-P26 (DPPV), excluding sequences coding for the signal peptides (Table 1). *DPPV* cDNA was amplified by two-step RT-PCR using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) and *Pfu* DNA polymerase (Promega); template RNA was extracted with RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), from a sample of mycelium grown in FHM. *DPPIV* cDNA was amplified by means

of *Pfu* polymerase from recombinant pUC18 containing the isolated *DPPIV* gene, because target fragment was devoid of introns. The comparison between cDNA and genomic sequences was performed following sequencing of both cDNAs (GIGA). *DPPIV* and *V* cDNAs, as well as the shuttle vector pPICZ $\alpha$ B, were digested with *Xho* I and *Not* I. Each cDNA insert was ligated into the vector with T4 DNA ligase (Invitrogen) in order to obtain pPICZ $\alpha$ B-r*DPPIV* and pPICZ $\alpha$ B-r*DPPV*. Bacteria transformed with ligation reaction were screened by performing and analyzing plasmid mini-preparations (Nucleospin Plasmid kit, Macherey-Nagel). Both constructions were then subjected to sequencing (GIGA). *P. pastoris* was electroporated (GenePulser, Bio-Rad) with pPICZ $\alpha$ B, pPICZ $\alpha$ B-r*DPPIV* or pPICZ $\alpha$ B-r*DPPV*, using recommended parameters for this species. Electroporated yeasts were grown on a medium supplemented with 1 M sorbitol (YPDS, EasySelect *Pichia* expression kit user manual, Invitrogen). In order to check the transformants for the integration of transforming cDNA, yeasts were submitted to DNA extraction using High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche), after prior grinding under liquid nitrogen; transforming constructions were amplified from genomic DNA with PCR Core System I (promega) and primers 3'AOX1 and 5'AOX1 (Invitrogen), shown in Table 1. The production of recombinant proteases was induced as previously described (Brouta *et al.*, 2002). Culture supernatant of *P. pastoris* was dialyzed against 20 mM Tris-HCl pH 8.6, and load on a Q-HP sepharose column (Amersham Biosciences). The flow-through fraction was collected and concentrated with an Amicon ultrafiltration cell (Millipore) using a filtration membrane with a size threshold of 30 kDa.

**Enzymatic assays.** *P. pastoris* culture supernatants containing r*DPPIV* or r*DPPV*, and pure *DPPV*, were tested for enzymatic activity using two *para*-nitroanilide (*pNa*) peptide derivatives as substrates, i.e. Gly-Pro-*pNa* (Sigma) and Lys-Ala-*pNa* (Bachem), and Keratin Azure (Sigma). Tests with *pNa* derivatives were performed at 37°C in 96-well plates, in 200  $\mu$ l Phosphate Buffered Saline (PBS) containing 0.5 mM substrate. Serial dilutions of the analyzed samples were tested, and a no substrate blank was set up for each reaction. Absorbances at 405 nm were measured at several time points during linear phase of enzymatic kinetics with a Multiskan RC spectrophotometer (ThermoLabSystems). Enzymatic activities were expressed in  $\mu$ mol of hydrolyzed substrate per hour and per  $\mu$ g of protein. Tests with Keratin Azure were carried out in 1 ml samples containing 4 mg substrate and supplemented with 1% dithiothreitol. After 20 h mild agitation at 37°C, tubes were centrifuged and absorbance of the collected supernatants was measured at 595 nm. Keratinolytic activities were expressed in arbitrary units (U), one unit corresponding to an increase of 0.001 absorbance units over 20 hour incubation.

All Keratin Azure tests were performed in triplicate.

In order to evaluate the contribution of *M. canis* DPPIV in the keratinolytic activity secreted by the fungus, Keratin Azure tests were performed in the above conditions with culture supernatant of the fungus grown in FHM, KM or CM for 15 days. Samples were added with 100  $\mu$ M Lys-[Z(NO<sub>2</sub>)]-pyrrolidide (Bachem), a specific DPPIV inhibitor; keratinolytic activity from samples with or without inhibitor were compared. Culture supernatants were shown beforehand to contain activity towards Gly-Pro-pNa, that could be inhibited by 99% by 100  $\mu$ M inhibitor. In all inhibition tests, samples were preincubated for 1 hour with the inhibitor.

**Evaluation of DPPV immunogenicity by skin testing in guinea pigs.** Skin tests were performed 30 days after experimental infection, on 12 infected and 3 non infected guinea pigs. Tested antigens were DPPV (4  $\mu$ g per site) and a crude *M. canis* exoantigen (10  $\mu$ g per site) previously shown to elicit DTH skin responses in guinea pigs following *M. canis* infection (Mignon *et al.*, 1999). Both antigens were heat-inactivated and injected intradermally in 100  $\mu$ l of 50  $\mu$ M ammonium bicarbonate. As a negative control, each guinea pig received 100  $\mu$ l of the ammonium bicarbonate solution. Each injection was performed in duplicate, on the flanks of the animals. DTH response was evaluated by subjective assessing of the inflammatory reaction at the injection sites, and objectivated by measuring the increase in skin thickness 24 h after injection with a micrometer gauge. Results were expressed as group mean values of individual mean increases in skin thickness. The Mann-Whitney U-test was used for statistical comparison of the results between the infected and non infected groups.

## Results

**Isolation and characterization of *M. canis* DPP genes.** The *M. canis* genomic library was screened with a 1250 bp probe from *T. rubrum* DPPIV. Restriction enzyme analysis of the hybridizing phages and Southern blotting with the same probe yielded a single 6 kb *Dra* I fragment containing hybridizing DNA. The fragment was subcloned into pUC18. Sequencing and sequence analysis revealed a long open reading frame (ORF) of 2394 bp, with a single intron after a first exon of only 6 bp. Molecular characteristics of *DPPIV* are summarized in Table 2. The deduced amino acid sequence displayed significant sequence homology to proteases of the S9B subfamily, i.e. the DPPIV subfamily among serine proteases, and the gene was named *M. canis DPPIV* (Genbank accession no. DQ286524). Representative examples of amino acid sequence alignments and percents identity/similarity are shown in figure 1 and table

3a, respectively. The sequence contained the catalytic triad Ser-Asp-His in the order characteristic for the S9 family, localized in the C-terminal part of the protein, and the conserved motif around active serine proper to S9B subfamily. *M. canis* DPPIV sequence aligned with a series of fungal, yeast, bacterial, protozoan and mammalian proteases, and displayed very high homology to other dermatophytic DPPIV.

Screening of the genomic library with the 1000 bp probe from *T. rubrum* DPPV led to the isolation and analysis of a 1.4 kb and a 3 kb *Hind* III fragments, each containing one part of a 2435 bp ORF comprising four introns, and homologous to proteases of the S9 subfamily; the gene was named *M. canis* DPPV (Genbank accession no. DQ286525). The deduced gene product also contained the catalytic triad of the S9 family, but could not be assigned to any subfamily on the basis of the conserved motif around catalytic serine. Molecular characteristics of DPPV are summarized in Table 2. Amino acid sequence alignments are presented in figure 1, and percents identity and similarity are shown in Table 3b. *M. canis* DPPV showed high homology to *T. rubrum* and *A. benhamiae* DPPV, to *A. fumigatus* DPPV, and to alanyl dipeptidyl peptidases from several organisms.

Southern blotting of enzyme-restricted *M. canis* genomic DNA, and subsequent hybridization with probes corresponding to full length *M. canis* DPPIV and V, did not allow the identification of paralogues for these two genes.

Amplification of heterologous probes from <i>T. rubrum</i>	
P1	ATGAAGCTCCTCTCGCTACT
P2	GAGACAGAGTAGACGTGTCG
P3	CCAAATCTGTCCTCATCAGC
P4	CTAGTAGTCGAAGTAAGAGT
Amplification of autologous probes	
P5	CCGCTCCAGCCCAGCATGAAG
P6	CATTCCTCTGCCTCTTCGCC
P7	ATGGCAGCAGCCAAATGGTTGATTGCCTCC
P8	TAGTAGTCGAAGTAAGAGTGAGCCTCATGGTC
<i>In vivo</i> detection of DPP mRNAs	
P9	TCATTCCTCTGCCTCTTCGCC
P10	CCGCTCCAGCCCAGCATGAAG
P11	GTTGTTGTTGCTCGAGAAAAGATTCACCCCAGAGGACTTCATC
P12	GTTGTTGTTGGCGCCGCTAGTAGTCGAAATAAGAGCC
P13	GCCATCCTCAAGGTTGATAC
P14	ACGTATTCAAGCTCTGGGTC
P15	GATGACATCACCAACGACTG
P16	CCTTGCAATCCGAAAGCTTG
Evaluation of <i>DPP</i> genes induction by real time RT-PCR	
P17	TCCCAGAGCTCCACCCT
P18	CGACGATGGGGCGAGAGC
P19	GGAAGGAAGTCAAGGCTCTC
P20	CCATCGGTCGTAGTTCTGACG
P21	ATGAAGTTCCTCTCGCTTCTTC
P22	GGACACACTCCTTGTAGGTC
Amplification of DPP cDNAs for the production of recombinant proteases	
P23	GTTGTTGTTGCTCGAGAAAAGAATTGTGCCCCCGGTGAGCC
P24	GTTGTTGTTGGCGCCGCTCATTCTCTGCCTCTTCGC
P25	GTTGTTGTTGCTCGAGAAAAGATTCACCCCAGAGGACTTCATC
P26	GTTGTTGTTGGCGCCGCTAGTAGTCGAAATAAGAGCC
Screening of <i>P. pastoris</i> transformants	
3' AOX1	GCAAATGGCATTCTGACATCC
5' AOX1	GACTGGTCCAATTGACAAGC

**Table 1:** Sequence of oligonucleotide primers (5' → 3') used in this study.

	<i>DPPIV</i>	<i>DPPV</i>
Gene length (coding sequence, base pairs)	2394	2435
Number of introns	1	4
Signal cleavage site (amino acid residues number)	15-16	19-20
Pro- sequence	No	No
Membrane anchoring	No	No
Mature protein length (amino acids)	775	726
Theoretical MW of mature polypeptidic chain	86.3	78.1
Calculated pI	6.30	6.84
Number of putative N-glycosylation sites	5	6
Genbank accession no.	DQ286524	DQ286525

**Table 2:** Molecular characteristics deduced from *M. canis* *DPPIV* and *DPPV* genomic sequences.

<b>(a)</b>	% identity	% similarity
<i>Trichophyton rubrum</i> DPPIV	90	96
<i>Aspergillus fumigatus</i> DPPIV	62	78
<i>Aspergillus oryzae</i> DPPIV	59	75
<i>Aspergillus fumigatus</i> dapB	29	44
Human CD26	28	46
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DPAPB	29	45
<i>Porphyromonas gingivalis</i> DPPIV	25	43
<i>Trypanosoma cruzi</i> Tc80	10	24
<i>Microsporium canis</i> DPPV	11	24

<b>(b)</b>	% identity	% similarity
<i>Trichophyton rubrum</i> DPPV	90	96
<i>Arthroderma benhamiae</i> DPPV	90	96
<i>Aspergillus fumigatus</i> DPPV	59	74

**Table 3:** Percent identity and similarity between *M. canis* DPPIV (a) or DPPV (b) and homologous proteins.



```

McDPPIV : LKITTFFEIKLPSGBSSLNVMQRLPENENEFKKYPVLFTPYGGPGAQEVSQAWKALDFK : 545
AfDPPIV : LENITYFELALPSGBTSLNVMQRLLVKESSEKKYPVLFTPYGGPGAQEVSKPWQALDFK : 545
CD26 : MPSKKLDFTILLN-ETKFWYQMILPEHEDDKSKKYPLLLLDVYAGPCSQKADTVFRLNWAT : 565
PgDPPIV : YNPKETIIKTSCSLELNAMIVKBIDEDESRHYPVLMVQYSGPNSQQVLDRYSFDWEH : 529

McDPPIV : AYITSDPELEYVTWTVDNRGTGFKRKRERSTVTKRLGFLEPDQQVFAAKEITLKNRWAD : 603
AfDPPIV : AYIASDPELEYTTWTVDNRGTGYKGRAERRCQVASRLGELEAADQVEAAQQAAKLEYVD : 603
CD26 : YLASTEN---IIVASEDGRSGYQGDKIMHAINRRLGTFEVEDQIEAARQFSKMGFVD : 620
PgDPPIV : YLASKG---YVACVDRGTGARGEEMRKCTYMQLGVFESDDQIAAATATGQLEPYVD : 583

McDPPIV : KDHVGMWGSYGCFLTAKTMETDSGVFTFGMSTAPVSDFRLYDSMYTERYMKTVELN- : 660
AfDPPIV : AOHIAWGSYGCFLTGKVIETDSGAFSLGVOTAPVSDWRFYDSMYTERYMKTLESN- : 660
CD26 : NKRIIAWGSYGCFVTSMVLGSGSGVEKCGIAVAPVSRWEYDSVYTERYMGLPTPED : 678
PgDPPIV : AARIGIWGSYGCFTLMSLCRGNGTERAGIAVAPVADWRFYDSVYTEREMRTPKENA : 641

McDPPIV : ADGYSETAVHKTDCFRNLKGHYLIQHGTGDDNVHFQNSAVLSNTLMNGGVTPDRLTTQ : 718
AfDPPIV : AAGYNASAIRVACYKNVRGGVLIQHGTGDDNVHFQNSAAALVDTLVGAGYTEERLQWQ : 718
CD26 : NLDHYRNSTVMSRABNEKQVEYLLIHGTADDNVHFQQSAQISKALVDYGVD---FQAM : 733
PgDPPIV : SGYKMSALDVAS---QLQGNLLIVSGADDNVHLQNTMLFTEALVQANLP---EDMA : 693

McDPPIV : WTDSHGRYDNDSTEQYNQLTRMVYDCKQRPQTTPLHQWSKRVLAALFGEEAE : 775
AfDPPIV : WTDSHGRYHGNVEYYQLSKRDYEEEKK-RKEKGEAHQWSKSVL----- : 765
CD26 : WTDEHGSASTAHQHYTHSHFKOCFSLP----- : 766
PgDPPIV : IMDKHHSYGCNTRYHYIRKAKEEDNL----- : 723

McDPPV : QIATPGR-PNRKLFYANEHDPQLKGLGPNDIEPLVDGARTKIHSWIVKPTGFDKNKVY : 468
Trir4 : QVATPDR-PNRKLFYANEHDPELPKGLGPNDIEPLVDGARTKIHSWIVKPTGFDKNKVY : 468
AfDPPV : YTAKPEKGVIKKIASANEIDPELKGLGPSDISEFYQGNFTDIHAWVIYPENFDKSKY : 470

McDPPV : PLAFLHGGPQGSWGDNWSTRWNPRVWADQYVVAPNPTGSTGFGQKLTDITNDWGG : 527
Trir4 : PLAFLHGGPQGSWGDNWSTRWNPRVWADQYVVAPNPTGSTGFGQKLTDITNDWGG : 527
AfDPPV : PLIEFFIHGGPQGNWADGWSTRWNPKAWADQYVVAPNPTGSTGFGQALTDAIQNNWGG : 529

McDPPV : APYKDLEKIWEHVRDNLKYVDTDNGIAAGASFGFFMINWIQQQELGRKFKALVSHDGTF : 586
Trir4 : APYKDLVKIWEHVDHTKYIDTDNGIAAGASFGFFMVNWIQQDLGRFKALVSHDGTF : 586
AfDPPV : APYDDLVKWEYVHENLDYVDTDHGAAGASYGFFMINWIQGSPLGRFKALVSHDGTF : 588

McDPPV : VGSSKIGTDELFFIEHDFNGTFFEARQNYDRWDCSKPEYVAKWSTPQLVVHSDYDFRLS : 645
Trir4 : VGSSKIGTDELFFIEHDFNGTFFEARQNYDRWDCSKPELVAKWSTPQLVVHNDEDFRLS : 645
AfDPPV : VADAKVSTEELEMQRENGTFDDARDNYRRWDPSAPERILQFATEMLVLHSDKDYRLP : 647

McDPPV : VAEGVGLFNVLQEKGVPSRLLNFPDESHWVTKPENSLVWHQQVLGWINKFSGINKSNPK : 704
Trir4 : VAEGVGLFNVLQEKGVPSRLLNFPDETHWVTKPENSLVWHQQVLGWVNKWSGINKSNPK : 704
AfDPPV : VAEGLSLFNVLQERGVPSRLLNFPDENHWVVNPENSLVWHQQALGWINKYSGVEKSNPN : 706

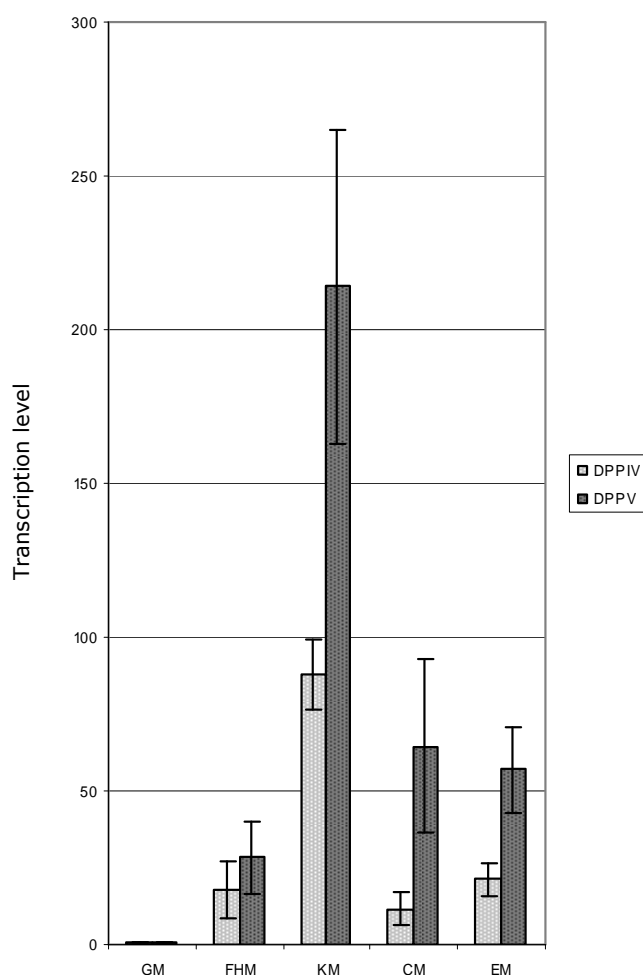
McDPPV : AIKLSDCKVEIVDHEAGSYFDY : 726
Trir4 : SIKLSDCPIEVDHEAHSYFDY : 726
AfDPPV : AVSLEDTVVPNYN----- : 721

```

**Figure 1:** Alignment of C-terminal part of DPPIV and DPPV with homologous proteins. McDPPIV: *Microsporium canis* DPPIV; AfDPPIV: *Aspergillus fumigatus* DPPIV; CD26: mammalian CD26 receptor or DPPIV; PgDPPIV: *Porphyromonas gingivalis* DPPIV; McDPPV: *Microsporium canis* DPPV; Tri r 4: antigen 4 or DPPIV from *Trichophyton rubrum*; AfDPPV: *Aspergillus fumigatus* DPPV. Catalytic residues are indicated by arrows, and conserved motif around catalytic serine is framed. Black shaded residues are identical, while grey shaded ones are homologous.

**In vivo detection of DPPIV and DPPV mRNAs.** Amplicons of the expected size (584 and 510 bp for DPPIV and V, respectively), were detected in both experimentally infected guinea pigs and in the naturally infected cat, demonstrating the *in vivo* expression of *M. canis* DPPs in these two species.

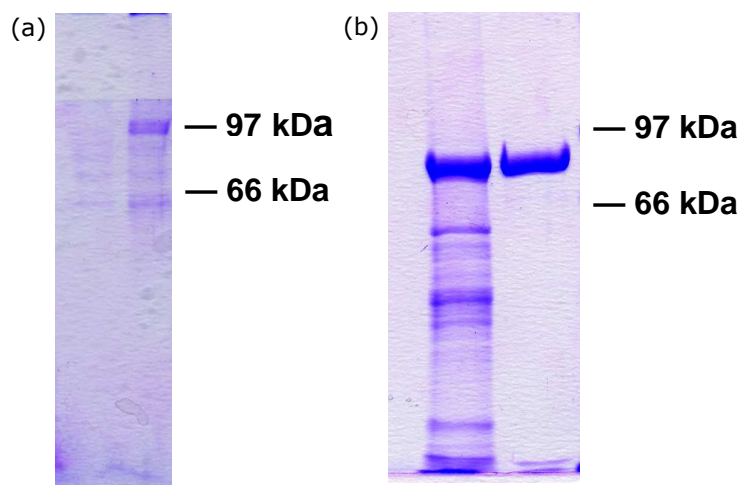
**Evaluation of DPPs expression levels on protein media.** Fungal growth was obtained on all the five tested media; DPPIV and DPPV mRNAs were detected in all analyzed samples. Expression level of both DPP genes was strongly increased when *M. canis* was grown on FHM, KM, CM or EM comparatively to GM. Level of DPPs mRNA was at least tenfold the level measured on GM, with the highest levels recorded on KM (Figure 2). A strong upregulation of both genes was also observed when the fungus was grown in 50 ml medium for two weeks (data not shown); however, expression levels were highly variable between replicate cultures, probably because of the variable growing stages reached by the fungus after long-term culture.



**Figure 2:** Induction levels of *M. canis* DPPs on complex protein media, measured by real time RT-PCR (+/- Standard Error of the Mean). GM: glucose medium; FHM: feline hair medium; KM : keratin medium; CM: collagen medium; EM: elastin medium.

**Production of recombinant proteases and activity on pNa substrates.** Culture supernatant of *P. pastoris* was harvested after 5 days induction. After SDS-PAGE electrophoresis,

recombinant DPPIV (rDPPIV) appeared as two bands of 95 and 98 kDa ; rDPPV MW (Molecular Weight) was of 83 kDa (figure 3a). Given the theoretical MW of polypeptidic chains encoded by the corresponding genes (86.3 and 78.1 kDa), rDPPIV and V should bear 9 or 12 kDa, and 5 kDa carbohydrates, respectively. In the case of rDPPV, that was confirmed by N:Glycosidase F treatment (Roche Applied Science) (data not shown). Recombinant proteases yields were of approximately 5 µg/ml and 50 µg/ml *P. pastoris* culture for rDPPIV and rDPPV, respectively.



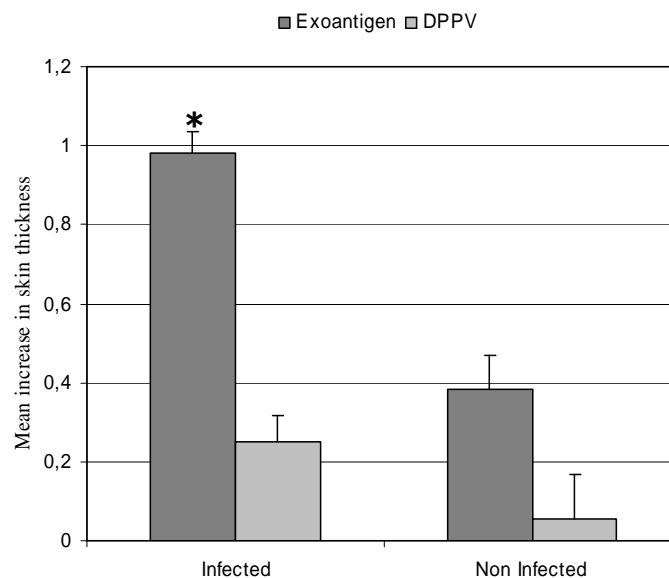
**Figure 3:** SDS-PAGE of recombinant *M. canis* DPPs. (a) right lane: control supernatant from *P. pastoris* transformed with parent vector. left lane: supernatant from *P. pastoris* transformed with pPICZαB-rDPPIV (b) right lane: supernatant of *P. pastoris* transformed with pPICZαB-rDPPV. left lane: purified *M. canis* DPPV.

*P. pastoris* culture supernatants contained DPPIV or DPPV activity as assayed with Gly-Pro-pNa and Lys-Ala-pNa, respectively. Under the same culture conditions, wild-type *P. pastoris* didn't produce any DPPIV or V activity (data not shown). Specific activity in culture supernatants of rDPPIV towards Gly-Pro-pNa and Lys-Ala-pNa were of 0.03 and 0.02 µmol/h/µg, respectively; those of rDPPV against Lys-Ala-pNa was of 0.14 µmol/h/µg total protein. Purified rDPPV showed an activity towards Lys-Ala-pNa of 0.25 µmol/h/µg protein, and has no activity towards Gly-Pro-pNa. Recombinant DPPIV activity in culture supernatant was inhibited by 88% with 5µM Lys-[Z(NO<sub>2</sub>)]-pyrrolidide, and by 99% with 100 µM of the inhibitor.

**Enzymatic assays with Keratin Azure.** Recombinant DPPIV and V in culture supernatants, as well as purified DPPIV, showed no keratinolytic activity. Mean keratinolytic activities of FHM, KM and CM supernatants were equal to 707, 434 and 316 U, respectively. These values did not

differ significantly from those obtained with specific DPPIV inhibitor.

**Skin testing.** Following the first experimental infection, all infected guinea pigs developed classical ringworm lesions as previously reported (Mignon *et al.*, 1999b). The second infection induced severe alopecia and crusting in three animals, the other ones showing only mild scaling and erythema. Non infected control guinea pigs never developed any lesion. The *M. canis* crude exoantigen used as a positive control induced an intense reaction, characterized by marked erythema and skin swelling, while rDPPV induced little or no cutaneous reaction. The mean increase in skin thickness is reported for each group and each antigen in figure 4. Difference between infected and non infected animals was statistically significant for crude exoantigen ( $p=0.009$ ), but not for rDPPV ( $p=0.22$ ). No difference in skin erythema or swelling was noted according to the symptomatic or asymptomatic character of reinfection, and no guinea pig presented IH reaction.



**Figure 4:** Mean increase in guinea pig skin thickness following intradermal injection of crude *M. canis* exoantigen or purified rDPPV (+/- Standard Error of the Mean). \* significant difference between infected and non infected animals ( $p=0.009$ ).

## Discussion

We have isolated two single *M. canis* genes, *DPPIV* and *DPPV*, coding for secreted dipeptidyl peptidases belonging to the S9 family of serine proteases. DPPIV was shown to be a prolyl dipeptidyl peptidase. Both genes are expressed *in vivo* and are strongly induced when the fungus is grown with extracellular matrix proteins, such as keratin, as the sole nitrogen source. Secreted recombinant DPPIV and V were obtained in the yeast *P. pastoris* and were

enzymatically active. Purified rDPPV induced unexpectedly low DTH reactions in experimentally infected guinea pigs, as assessed by skin tests. Sensitivity of *M. canis* secreted keratinolytic activity to a specific DPPIV inhibitor was unaffected, while both rDPPIV and rDPPV had no keratinolytic activity by themselves.

Proteins related to *M. canis* DPPIV and V are from very different microbial and animal origins, and are described in pathogenic as well as in non pathogenic microorganisms. For example, *M. canis* DPPIV is homologous to DPPIV from the non pathogenic fungus *A. oryzae*, which plays an important role in the production of dipeptides and free amino acids from proteic substrates during food fermentations (Doumas *et al.*, 1998; Byun *et al.*, 2001); remarkably, the two proteases share exactly the same particular intron-exon structure with a single intron and the first exon being only 6 bp long. The function of *M. canis* DPPs could thus be related to fine digestion of keratin degradation products. This view of a universal function in the digestion of peptides is reinforced by the observation that isolated *DPP* genes are also inducible on Sabouraud's medium, which is a peptone-based medium (unpublished data). Furthermore, the release of soluble peptides from Keratin Azure by *M. canis* culture filtrate containing DPPIV activity was insensitive to a specific DPPIV inhibitor, what suggests that the enzyme action on keratin, if any, occurs downstream to the endoprotease action. However, disruption of the *A. oryzae* *DPPIV* gene and subsequent abolishing of all secreted prolyl dipeptidyl peptidase activity did not impair fungal growth on a wheat gluten-based broth, albeit a proline-rich substrate (Doumas *et al.*, 1998). It is thus possible that *M. canis* DPPs, or at least DPPIV, are non essential *in vitro*; this idea is also supported by the very low DPPIV and V activity measured in all the tested culture supernatants when compared to specific activity of secreted subtilases (data not shown). In addition, although most filamentous fungi seem to possess an intracellular DPPIV-like protease, assumed to be involved in protein maturation, some non pathogenic species are merely devoid of secreted DPPIV (Jalving *et al.*, 2005); interestingly, it is the case of at least one *Aspergillus* species, *A. niger*.

On the other hand, several proteases homologous to *M. canis* DPPIV were definitely involved in pathogenic processes, or have properties suggesting a specific role *in vivo* in infection. It is the case of *A. fumigatus* DPPIV, which cleaves several biological peptides in virtue of its Pro-X peptidase activity, and can bind to fibronectin (Beauvais *et al.*, 1997b). Furthermore, mammalian DPPIV, the CD26 marker, participates in numerous physiological and pathological processes, both as an enzyme and as a receptor (Boonacker and Van Noorden, 2003). Noteworthy, it is able to activate or inactivate chemokines and cytokines (Bauvois *et al.*, 1992; Mentlein, 1999). In the bacterium *Porphyromonas gingivalis*, responsible for human

periodontitis, DPPIV has proved to contribute directly to bacterial virulence, through the destruction of collagen in combination with host proteases, the decrease of inflammatory cells mobilization, and the participation in adherence to fibronectin (Kumagai *et al.*, 2000, 2003, 2005; Yagishita *et al.*, 2001). Additionally, in pathogenic *Streptococcus* spp., strains that are deficient for an extracellular prolyl dipeptidyl peptidase from the S15 family showed attenuated virulence (Rigolet *et al.*, 2005). Direct participation in pathogenesis was also demonstrated for several protozoan exoproteases from the S9 family; for example, enzymatic activity of prolyl oligopeptidase Tc80 from *Trypanosoma cruzi* is necessary for host cells invasion (Bastos *et al.*, 2005). Taken together, these observations suggest that DPPIV in *M. canis* and other pathogens could have evolved to play specialized roles *in vivo* in the host-pathogen relationship.

We showed that both *M. canis* DPPs are expressed *in vivo*, in experimentally infected guinea pig and in naturally infected cat. This constitutes basic support to the view that these proteases are potential virulence factors. In addition, *DPP* genes are strongly induced when the fungus is cultivated on a medium containing extracellular matrix proteins, in the form of feline hair, powdered keratin, elastin or collagen. This supports the role played by DPPs as part of the dermatophytic secreted proteases battery allowing the cooperative degradation of cell cornified envelope (Monod *et al.*, 2005). *DPPs* upregulation on collagen or elastin medium likely reflects a more general gene derepression whenever complex proteins are the only carbon and nitrogen source. Similarly, expression of the *DPPV* gene from the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* is inducible by keratin and elastin (Kaufman *et al.*, 2005). These authors reported induction levels far lower than those from the present study; although these differences could be linked to the experimental conditions, they can also be related to behavioural differences among dermatophyte species.

There is now a considerable body of evidence that DTH in response to skin testing is the hallmark of a protective immune response against dermatophytosis. In this study, only slight or absent DTH skin reactions were observed in response to *M. canis* rDPPV. This contrasts with results obtained in *T. tonsurans*, for which native DPPV was shown to be a major DTH inducer (Woodfolk *et al.*, 1996). However, the recombinant form of *T. rubrum* DPPV, produced by *P. pastoris*, also failed to elicit DTH reactions in previously infected individuals (Woodfolk *et al.*, 1998). As it is rather unlikely that so different immune responses are elicited by highly homologous proteinases, the most probable explanation is that the recombinant form of DPPV, contrary to the native form, doesn't bear the relevant T-cell epitopes. In the bacterium *Brucella melitensis*, a similar phenomenon was reported with a ribosomal protein, which lost its DTH-eliciting properties when injected under a recombinant form obtained in *Escherichia coli*,

because of a lacking post-translational acylation (Bachrach *et al.*, 1997). In the case of dermatophyte DPPV, since a yeast expression system was used, it is reasonable to postulate that the immunogenic properties can be altered by improper glycosylation, a post-translational protein modification influencing recognition and processing of T cell epitopes (Engelhard *et al.*, 2006).

In conclusion, two *M. canis* secreted exoproteases, which add to the range of proteolytic enzymes thought to be complementary tools for the digestion of hard keratinized structures, have been characterized at the genetic level. Given their enzymatic properties and their homology to putative or proved virulence factors, they could also have specialized functions in host-fungus relationship. Availability of gene and mRNA sequence will allow precise elucidation of their roles through gene inactivation, while recombinant DPPIV and V will be valuable tools for further study of enzymatic, binding, and immunological properties of both proteases.

## Acknowledgements

This work was supported by grant n° 3.4595.04 from Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (FRSM). Sandy Vermout, Jérémy Tabart and Aline Baldo are recipients of a studentship of F.R.I.A. (Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture, rue d'Egmont 5, 1000 Bruxelles).

## References

Bachrach G, Banai M, Fishman Y, Bercovier H. Delayed-type hypersensitivity activity of the *Brucella* L7/L12 ribosomal protein depends on posttranslational modification. *Infect Immun* 1997; 65: 267-71.

Bastos IM, Grellier P, Martins NF, Cadavid-Restrepo G, de Souza-Ault MR, Augustyns K, Teixeira AR, Schrevel J, Maigret B, da Silveira JF, Santana JM. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochem J* 2005; 388: 29-38.

Bauvois B, Sanceau J, Wietzerbin J. Human U937 cell surface peptidase activities: characterization and degradative effect on tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 1992; 22: 923-930.

Beauvais A, Monod M, Debeaupuis JP, Diaquin M, Kobayashi H, Latgé JP. Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. J Biol Chem 1997a; 272: 6238-6244.

Beauvais A, Monod M, Wyniger J, Debeaupuis JP, Grouzmann E, Brakch N, Svab J, Hovanessian AG, Latge JP. Dipeptidyl-peptidase IV secreted by *Aspergillus fumigatus*, a fungus pathogenic to humans. Infect Immun 1997b; 65: 3042-3047.

Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. Eur J Cell Biol 2003; 82: 53-73.

Brouta F, Descamps F, Fett T, Losson B, Gerday C, Mignon B. Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporum canis*. Med Mycol 2001; 39: 269-275.

Brouta F, Descamps F, Monod M, Vermout S, Losson B, Mignon B. Secreted metalloprotease gene family of *Microsporum canis*. Infect Immun 2002; 70, 5676-5683.

Byun T, Kofod L, Blinkovsky A. Synergistic action of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase and a non-specific aminopeptidase in protein hydrolysis. J Agric Food Chem 2001; 49: 2061-2063.

Descamps F, Brouta F, Monod M, Zaugg C, Baar D, Losson B, Mignon B. Isolation of a *Microsporum canis* gene family encoding three subtilisin-like proteases expressed *in vivo*. J Invest Dermatol 2002; 119, 830-835.

Doumas A, van den Broek P, Affolter M, Monod M. Characterization of the prolyl dipeptidyl peptidase gene (dppIV) from the koji mold *Aspergillus oryzae*. Appl Environ Microbiol 1998; 64: 4809-4815.

Engelhard VH, Altrich-Vanlith M, Ostankovitch M, Zarling AL. Post-translational modifications of naturally processed MHC-binding epitopes. Curr Opin Immunol 2006; 18: 92-97.



Girardin H, Latgé JP. DNA extraction and quantitation. In: Maresca B, Kobayashi GS, eds. *Molecular Biology of Pathogenic fungi: A Laboratory Manual*, New York: Telos Press, 1994: 5-9.

Hebart H, Bollinger C, Fisch P, Sarfati J, Meisner C, Baur M, Loeffler J, Monod M, Latge JP, Einsele H. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood* 2002; 100: 4521-4528.

Jalving R, Godefrooij J, Veen WJ, van Ooyen AJ, Schaap PJ. Characterisation of the *Aspergillus niger* dapB gene, which encodes a novel fungal type IV dipeptidyl aminopeptidase. *Mol Genet Genomics* 2005; 273: 319-325.

Jousson O, Lechenne B, Bontems O, Capoccia S, Mignon B, Barblan J, Quadroni M, Monod M. Multiplication of an ancestral gene encoding secreted fungalysin preceded species differentiation in the dermatophytes *Trichophyton* and *Microsporum*. *Microbiology* 2004a; 150, 301-310.

Jousson O, Lechenne B, Bontems O, Mignon B, Reichard U, Barblan J, Quadroni M, Monod M. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. *Gene* 2004b; 339, 79-88.

Kaufman G, Berdicevsky I, Woodfolk JA, Horwitz BA. Markers for host-induced gene expression in *Trichophyton* dermatophytosis. *Infect Immun* 2005; 73: 6584-6590.

Kobayashi H, Debeaupuis JP, Bouchara JP, Latge JP. An 88-kilodalton antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1993; 61: 4767-4771.

Kumagai Y, Konishi K, Gomi T, Yagishita H, Yajima A, Yoshikawa M. Enzymatic properties of dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* and its participation in virulence. *Infect Immun* 2000; 68: 716-724.

Kumagai Y, Yajima A, Konishi K. Peptidase activity of dipeptidyl aminopeptidase IV produced by *Porphyromonas gingivalis* is important but not sufficient for virulence. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 735-743.

Kumagai Y, Yagishita H, Yajima A, Okamoto T, Konishi K. Molecular mechanism for connective tissue destruction by dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2005; 73: 2655-2664.

Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12: 310-350.

Meintlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)-role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul pept* 1999; 85: 9-24.

Mignon B, Swinnen M, Bouchara JP, Hofinger M, Nikkels A, Pierard G, Gerday C, Losson B. Purification and characterization of a 31.5 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. *Med Mycol* 1998a; 36: 395-404.

Mignon BR, Nikkels AF, Pierard GE, Losson BJ. The *in vitro* and *in vivo* production of a 31.5-kD keratinolytic subtilase from *Microsporum canis* and the clinical status in naturally infected cats. *Dermatology* 1998b; 196: 438-441.

Mignon B, Leclipteux T, Focant C, Nikkels A, Pierard G, Losson B. Humoral and cellular immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporum canis* in experimentally infected guinea pigs. *Med Mycol* 1999; 37: 123-129.

Monod M, Léchenne B, Jousson O, Grand D, Zaugg C, Stöcklin R and Grouzmann E. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Microbiology* 2005; 151: 145-155.

Rigolet P, Xi XG, Rety S, Chich JF. The structural comparison of the bacterial PepX and human DPP-IV reveals sites for the design of inhibitors of PepX activity. *FEBS J* 2005; 272: 2050-2059.

Sambrook J, Fritsch FF, Maniatis T. *Molecular cloning : a Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Slunt JB, Taketomi EA, Woodfolk JA, Hayden ML, Platts-Mills TA. The immune response to *Trichophyton tonsurans*: distinct T cell cytokine profiles to a single protein among subjects with immediate and delayed hypersensitivity. *J Immunol* 1996; 157: 5192-5197.

Van Cutsem J. Animal models for dermatomycotic infections. In: McGinnis MR, Borgers M, eds. *Current Topics in Medical Mycology* (1989) Vol. 3 New York: Springer-Verlag pp: 1–35.

Woodfolk JA, Slunt JB, Deuell B, Hayden ML, Platts-Mills TA. Definition of a *Trichophyton* protein associated with delayed hypersensitivity in humans. Evidence for immediate (IgE and IgG4) and delayed hypersensitivity to a single protein. *J Immunol* 1996; 156: 1695-1701.

Woodfolk JA, Wheatley LM, Piyasena RV, Benjamin DC, Platts-Mills TA. *Trichophyton* antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity. Sequence homology to two families of serine proteinases. *J Biol Chem* 1998; 273: 29489-29496.

Yagisihta H, Kumagai Y, Konishi K, Takahashi Y, Aoba T, Yoshikawa M. Histopathological studies on virulence of dipeptidyl aminopeptidase IV (DPPIV) of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse abscess model: use of a DPPIV-deficient mutant. *Infect Immun* 2001; 69: 7159-7161.

**ETUDE 3 : MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'INACTIVATION GENIQUE PAR L'ARN CHEZ *MICROSPORUM CANIS*. CONSTRUCTION DE SOUCHES DEFICIENTES AU NIVEAU DE LA DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV DE *M. CANIS*, ET DE SOUCHES DEFICIENTES AU NIVEAU D'UNE SUBTILASE KERATINOLYTIQUE DE 31,5 kDa (SUB3)**

# RNA silencing in the dermatophyte *Microsporium canis*

Sandy Vermout<sup>1</sup>, Jérémy Tabart<sup>1</sup>, Aline Baldo<sup>1</sup>, Michel Monod<sup>2</sup>, Bertrand Losson<sup>1</sup> & Bernard Mignon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Infectious & Parasitic Diseases, Parasitology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium

<sup>2</sup>Dermatology Service, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne, Switzerland

**Running title:** RNA silencing in *Microsporium canis*

**Keywords:** *Microsporium canis*, dermatophyte, RNA silencing, *SUB3*, *DPPIV*

## Summary

Dermatomycoses caused by *Microsporium canis* are frequent in domestic animals and easily transmissible to humans. Several proteases secreted by this fungus were identified as potential virulence factors, but the construction of deficient strains is required to investigate their role in the pathogenesis of the disease. Using target genes encoding two of these proteases, a first evaluation of the utility of RNA-mediated silencing as a reverse genetic tool in dermatophytes was carried out. *SUB3* and *DPPIV*, respectively coding for a subtilisin and a dipeptidyl peptidase, were both down-regulated, by means of two plasmid constructs designed to express a RNA hairpin that corresponds to part of their respective sequence. The degree of attenuation was evaluated by enzymatic assay of the transformants culture supernatants, and by real time RT-PCR. Enzymatic activities and expression levels varied from less than 5% to 100% of that of control transformants obtained with plasmid without hairpin inserts. Inhibition was globally more efficient for *SUB3* than for *DPPIV*. These results show that RNA silencing can be used for functional genomics in *M. canis*, and particularly to circumvent the limits and technical difficulties of conventional disruption methods.

## Introduction

Dermatophytic infections with the ascomycete *Microsporum canis* are common contagious skin mycoses in cats and dogs. In addition to being a frequent and worldwide concern in veterinary medicine, dermatophytosis caused by *M. canis* is also of great zoonotic importance. To date, little is known about the pathogenesis of the infection. Proteolytic enzymes are thought to be key factors in the invasion of keratinized structures like hair, nails, and *stratum corneum*. Among them, a family of metalloproteases (Brouta *et al.*, 2002; Jousson *et al.*, 2004a), a family of subtilisins (Descamps *et al.*, 2002), and two dipeptidyl peptidases (GenBank accession nos. DQ286524 and DQ286525) have been characterized at the gene level. However, definitive evidence of their implication as virulence factors would require the construction of deficient strains.

Conventional gene disruption is widely used to knock out genes in filamentous fungi; however, this strategy is time-consuming and greatly hampered by the poor efficiency of homologous recombination in these organisms (Weld *et al.*, 2006; Nakayashiki, 2005). In dermatophytes, the low transformation frequency (Gonzalez *et al.*, 1989) constitutes an additional problem. In spite of these difficulties, functional gene investigation by means of gene disruption was performed in *Trichophyton rubrum* (Fachin *et al.*, 2006; Ferreira-Nozawa *et al.*, 2006) and *M. canis* (Yamada *et al.*, 2006). In the latter study, homologous recombination efficiency was of 2%. An alternative method for gene silencing, RNA interference (RNAi), could be helpful for functional gene investigation. This technique is based on a natural phenomenon, by which a double stranded RNA (dsRNA) induces enzymatic degradation of messenger RNAs (mRNAs) in a sequence-specific manner. This post-transcriptional inhibition pathway was first described in the nematode *Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1998), and since it is known to operate in a wide variety of eukaryotic organisms, including filamentous fungi. In fungal systems, assessments of the silencing ability of different RNA species showed that double stranded RNA in the form of a 500 to 1000 base pairs (bp) hairpin, with a relatively short intron-containing loop, was the more potent trigger for interference (Liu *et al.*, 2002; Kadotani *et al.*, 2003; Goldoni *et al.*, 2004; Rappleye *et al.*, 2004; Nakayashiki *et al.*, 2005; Yamada *et al.*, 2007).

Hairpin-induced RNA silencing for the functional investigation of fungal genes has never been utilized so far in dermatophytes. We tested its applicability to silence two genes in *M. canis*, *SUB3* and *DPPIV*. *SUB3* encodes a major immunogenic and keratinolytic endopeptidase of the subtilisin family (Mignon *et al.*, 1998a, 1999a, b; Descamps *et al.*, 2002, 2003), and is inducible in a medium containing protein as sole source of carbon and nitrogen.

*DPPIV* encodes a dipeptidyl peptidase, which selectively removes an X-Pro dipeptide from the N-terminus of large peptides. The DPPIV protein is an analog of immunomodulatory and tissue-degrading factors (Beauvais *et al.*, 1997; Boonacker & Van Noorden, 2003; Yagishita *et al.*, 2001; Kumagai *et al.*, 2005). In this study, *SUB3* and *DPPIV* were down-regulated by means of integrative plasmid constructs intended to express a RNA hairpin corresponding to a fragment of their specific sequence.

## Materials and methods

### Strains and culture conditions

For plasmid multiplication, *Escherichia coli* TOP10 (Invitrogen) were grown in Luria-Bertani (LB) medium, with 100 µg/ml ampicillin when selection was required. *M. canis* strain IHEM 21239 was used for fungal transformation. RNA used as template to obtain gene fragments was extracted from the fungus grown on a feline hair-based medium (Mignon *et al.*, 1998b). Fungal mass for the production of protoplasts was obtained by inoculation of 50 ml liquid Sabouraud's medium (Sab; 2% glucose, 1% peptone) with a plug of mycelium grown on S10 plates (0.2% glucose, 0.1% peptone, 0.1% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), and subsequent incubation at 27°C for 3 to 5 days. All newly obtained transformants were first grown in Sab containing 100 µg/ml hygromycin in order to confirm their resistant phenotype. They were then transferred in sterile distilled water for short-term conservation at room temperature. For subsequent analysis, pS1-*SUB3* transformants were grown in 2.5 ml of a keratin medium (KM; 50 mM phosphate buffer, 0.5% glucose, 0.05 mg/ml inositol, 0.01 mg/ml pyridoxine, 0.01 mg/ml thiamine, 2 mM MgSO<sub>4</sub>, 0.25% powdered bovine keratin (ICN)) containing 100 µg/ml hygromycin. pS1-*DPPIV* transformants were grown in the same volume of Sab broth containing 100 µg/ml hygromycin. All cultures were carried out at 27°C for 4 to 5 days.

### Construction of silencing vectors pS1-*SUB3* and pS1-*DPPIV*

Two constructs were obtained. The first one coded for a RNA hairpin with sequences identical to a part of *SUB3*. The second one coded for a RNA hairpin with sequences identical to a part of *DPPIV*. In that purpose, inverted repeats were cloned into the plasmid pSilent-1 (Nakayashiki *et al.*, 2005), provided by the Fungal Genetics Stock Center (McCluskey, 2003). A map of each construct is shown in figure 1. The plasmid pSilent-1 carries the *E. coli* hygromycin B phosphotransferase gene (*HPH*) as a selection marker in fungus transformations, and a transcription unit driven by the *Aspergillus nidulans* constitutive *trpC* promoter, with two

multiple cloning sites separated by an intron-containing spacer.

Inverted repeats of *SUB3* and *DPPIV* fragments consisted of stretches of 688 and 596 bp, respectively. They were amplified from *M. canis* RNA extracted with RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) after grinding of mycelium under liquid nitrogen. RNA was treated with RQ1 DNase (Promega) and converted to complementary DNA (cDNA) with iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Standard PCRs were performed (55°C, 30 cycles) using *Taq* polymerase (Promega), or iProof DNA polymerase (Bio-Rad) when blunt-end ligation was planned. For each gene, two pairs of oligonucleotide primers were designed (primers P1-P2 and P3-P4 for *SUB3*; primers P5-P6 and P7-P8 for *DPPIV*; Table 1). Both pairs delimit the same DNA fragment, but include a tail with different restriction sites, to ensure cloning of the two fragments in opposite directions. PCR products were gel purified with Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega). The first fragment of each gene was simply ligated into pSilent-1 after creation of compatible ends and dephosphorylation of the vector with Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP, Promega), using T4 DNA ligase (Invitrogen). The second fragment of *SUB3* and *DPPIV* had to be inserted into the recombinant plasmid by a two-step ligation, due to the inefficiency of conventional ligation. Vector was double-digested with *SphI/StuI* (for *SUB3*) and *SphI/BglIII* (for *DPPIV*), dephosphorylated, and joined to the digested *Sph I* end of each insert. Linear constructions that were obtained were then circularized by a second ligation, creating the silencing vectors pS1-*SUB3* and pS1-*DPPIV*. While pS1-*SUB3* circularization was blunt-end, pS1-*DPPIV* was first digested with *BglIII*. Intermediate and final vectors were propagated in *E. coli*, purified by plasmid mini-preparations (Nucleospin Plasmid Kit, Macherey-Nagel), and checked by a series of restriction digestions followed by agarose gel electrophoresis (data not shown).



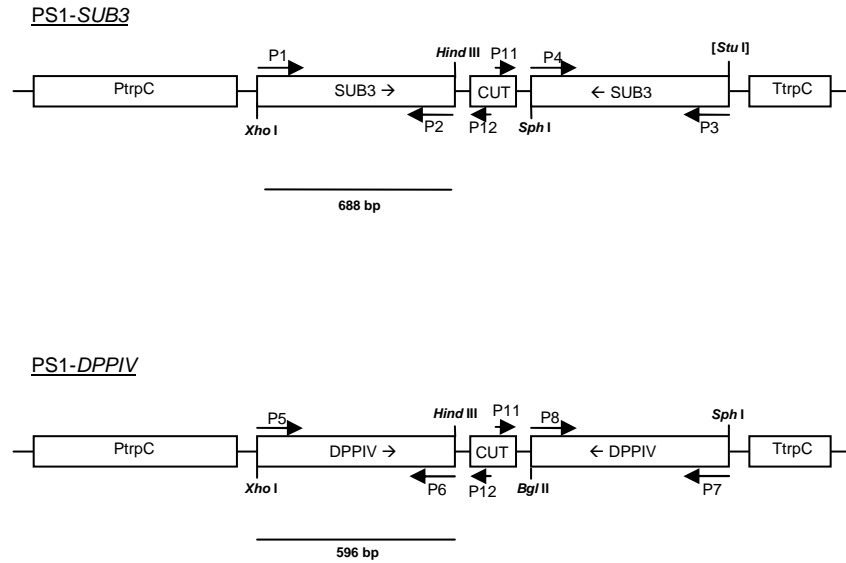


Figure 1 : Map of the constructions used for *SUB3* and *DPPIV* down-regulation. Inverted repeats of *SUB3* and *DPPIV* fragments are shown on both sides of the spacer segment constituted by an intron from the *Magnaporthe oryzae* cutinase gene (CUT). They are flanked by the *trpC* promoter (PtrpC) and terminator (TtrpC) from *Aspergillus nidulans*. Oligonucleotide primers used for the obtention and detection of the constructions are represented as numbered arrows (see Table 1).

## Transformation

Polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation of fungal protoplasts was performed, with midi-preparations of plasmids (Quantum Prep kit, Bio-Rad). Mycelium was harvested on two layers of Miracloth (Calbiochem), extensively washed with Digestion Buffer (DB; 100 mM potassium phosphate buffer pH 5.8, 0.8 M NaCl), and finely chopped with a scalpel blade. Cell wall was digested in portions of 10 ml DB added with 20 mg/ml Lysing Enzymes from *Trichoderma harzianum* (Sigma), under mild agitation at 33°C. Protoplasts formation was monitored under microscope and stopped when protoplasts concentration exceeded  $10^7$  per ml. Protoplasts were separated from mycelial debris by filtration through 4 layers of Miracloth and pelleted by centrifugation (5 min, 1500 g). Pellet was washed in DB and let stand for at least 10 min at room temperature. It was then washed in cold STC buffer (10 mM Tris-Cl pH 7.5, 1.2 M sorbitol, 10 mM  $\text{CaCl}_2$ ) and harvested; protoplasts concentration was adjusted to 1 to  $2 \cdot 10^8$  per ml with STC. Twenty micrograms of circular pS1-*SUB3*, pS1-*DPPIV* or parent pSilent-1 were added to 120  $\mu\text{l}$  of protoplasts suspension and incubated on ice for 20 min. The suspension was mixed with 40  $\mu\text{l}$  of 60% PEG 3350 (Sigma) in 10 mM Tris-Cl pH 7.5 and 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , and incubated on ice for 20 min; 400  $\mu\text{l}$  extra PEG solution was then

added to the suspension, which was further incubated on ice for 20 min. Transformed protoplasts were regenerated at 27°C on Sab plates containing 1.2 M sorbitol (Sab Sorb), as follows. They were poured on the plates in Soft Medium (Sab Sorb containing 0.4% agarose) and overlaid 24 hours later with Soft Medium supplemented with hygromycin, to a final concentration of 100 µg/ml.

### **PCR testing of the transformants**

Transformants were subjected to DNA extraction and standard PCR, in order to check for the presence of the hygromycin resistance gene (*HPH*), of the hairpin-encoding construct, and to confirm the integrity of endogenous target genes. Plugs of mycelium were digested with Lysing Enzymes, harvested by centrifugation and resuspended in a 0.01 M phosphate buffered saline (PBS). DNA was purified from lysed mycelium using High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche). PCR was performed with *GoTaq* polymerase (Promega). Primers P9-P10 were used for *HPH* detection; primers P13-P14 and P15-P16 served for the amplification of endogenous *SUB3* and *DPPIV*, respectively (Table 1). Both arms of hairpin constructs were detected separately, using primers that hybridize in the spacer region (Table 1). As shown in figure 1, primer pairs P12-P1 and P11-P3 were used to detect arms of the *SUB3* construct, as were primer pairs P12-P5 and P11-P7 for arms of the *DPPIV* construct.

### **Enzymatic assays on culture supernatants**

As mentioned above, pS1-*SUB3* and pS1-*DPPIV* transformants were cultured on KM and Sab broth, respectively. Culture supernatants were harvested by centrifugation. Total protein concentration was determined using the standard method of Bradford, with dilutions of Bovine Serum Albumine as standards. For the assessment of *SUB3* activity, 20 µl of 5 mM N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilide (AAPF-*p*Na, Sigma) were mixed with 20 µl of supernatant in a total volume of 200 µl. *DPPIV* activity was assayed by mixing 100 µl of 2 mM Gly-Pro- *p*-nitroanilide (GP-*p*Na, Sigma) and 100 µl of supernatant. A no substrate blank was set up for each reaction. Tests were performed at 37°C. Absorbances were measured at several time points during linear phase of enzymatic kinetics, at 405 nm, with a Multiskan RC spectrophotometer (ThermoLabsystems). For each supernatant, enzymatic activity was calculated in arbitrary units, one unit corresponding to an increase of one absorbance unit per minute. Specific activity was then calculated by dividing enzymatic activity by total protein concentration. Residual specific activity levels were obtained, by expressing specific activities in percents with regard to the mean specific activity of four pSilent-1 transformants. A mean

residual specific activity was then calculated for all tested pS1-*SUB3* and pS1-*DPPIV* transformants.

### **Real time RT-PCR**

Fungal RNA was extracted with TriPure reagent (Roche) according to manufacturer's instructions, mycelium samples being homogenized by grinding under liquid nitrogen. Reverse transcription was performed using iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) after treatment of RNA solutions with RQ1 DNase (Promega). Real-time PCR reactions were assembled with qPCR Mastermix Plus for SYBR Green I – No ROX kit (Eurogentec) and subjected to the following protocol in a iCycler (Bio-Rad) : 2 min at 50°C, 10 min at 95°C, and 45 cycles of 15 sec at 95°C, 20 sec at 60°C, 40 sec at 72°C. *M. canis* actin was used as the normalizer gene. Primer pairs P17-P18, P19-P20, and P20-P21 were used to detect actin, *SUB3*, and *DPPIV* mRNAs, respectively (Table 1); they were designed so that they don't hybridize within the gene regions corresponding to inhibitory hairpins. All assays were performed in duplicate. Specificity of each reaction was confirmed by agarose gel electrophoresis and by performing a melting curve. Results in terms of cycle thresholds were converted in folds actin expression using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, and then expressed in percents with regard to the mean value obtained for at least two control transformants per run. Method was validated by assaying serial dilutions of a series of samples.

Amplification of <i>SUB3</i> and <i>DPPIV</i> inverted repeats		
P1	GTTGTTGTTG <u>CTCGAG</u> CGCCGAGGACTTCGACTCC	
P2	GTTGTTGTTGA <u>AAGCTT</u> CGAAGATACCAGCATTCTG	688
P3	GTTGTTGTTGGGGCCCCGCGAGGACTTCGACTCC	
P4	GTTGTTGTTGG <u>CATGCC</u> GAAGATACCAGCATTCTG	688
P5	GTTGTTGTTG <u>CTCGAGT</u> ACCGTCACTCCTATTTTG	
P6	GTTGTTGTTGA <u>AAGCTT</u> GACAATCTTCTGTATCC	596
P7	GTTGTTGTTGG <u>CATGCT</u> ACCAACTACACCAAGCAG	
P8	GTTGTTGTTG <u>AGATCT</u> TGAACACGGTTAAAGGCAC	596
<i>HPH</i> detection		
P9	GCTTTCAGCTTCGATGTAGG	
P10	GCATCAGCTCATCGAGAGC	441
Hairpin constructs detection		
P11	GGAGACTTGTGGCCATG	
P3	GTTGTTGTTGGGGCCCCGCGAGGACTTCGACTCC	783
P7	GTTGTTGTTGGCAGCTACCAACTACACCAAGCAG	683
P12	GTGGGGACACTATTCGGC	
P1	GTTGTTGTTGCTCGAGCGCCGAGGACTTCGACTCC	774
P5	GTTGTTGTTGCTCGAGTACCGTCACTCCTATTTTG	682
Confirmation of endogenous <i>SUB3</i> and <i>DPPIV</i> integrity		
P13	ATGGGCTGCATCAAGGTTATC	
P14	CTATCTTCCACTTCCGTTGTAGAG	1402
P15	CCGCTCCAGCCCGGCATGAAG	
P16	TCATTCTCTGCCTCTTCGCC	2343
Real time PCR experiment		
P17	TCCCAGAGCTCCACCCT	
P18	CGACGATGGGGCGAGAGC	282
P19	GTACCATCGTTGACATCTACGC	
P20	GTCCTGGGTTCTTGATAAC	205
P21	ATGAAGTTCTCTCGCTTCTTC	
P22	GGACACACTCCTTGTAGGTC	118

Table 1. Sequence of oligonucleotide primers (5'→3') and length of amplicons (bp). Restriction sites are underlined.

## Results

Gene silencing in *M. canis* was carried out by transforming the fungus with integrative plasmid constructs derived from the pSilent-1 silencing vector, which was previously developed for ascomycete fungi (Nakayashiki *et al.*, 2005). Constructions were designed to express part of the target genes as RNA hairpins of 688 and 596 bp, for *SUB3* and *DPPIV* respectively, and bearing a loop constituted by a 147 bp intron from the *Magnaporthe oryzae* cutinase gene.

Forty-seven, forty-three, and thirty-five transformants were obtained with parent pSilent1, pS1-*SUB3* and pS1-*DPPIV*, respectively. All transformants showed a growth similar to that of the wild type strain IHEM 21239 on Sab. Enzymatic activity towards AAPF-*pNa* was measured in culture supernatants of pS1-*SUB3* transformants grown in KM. Calculated residual specific activities were highly variable, ranging from 3.3% to more than 100% when compared to the mean value for pSilent1 transformants. The range of values obtained for residual specific activity, with a mean of 27.8%, is shown in figure 2. Only 1 colony out of 43 reached the mean level of the controls. Activity towards GP-*pNa* was assayed in culture supernatants of pS1-*DPPIV* transformants grown in Sab broth. Residual specific activities varied from 45.6% to more than 100% of the pSilent1 transformants, with a mean value of 69.4% (Figure 2). Five colonies out of 35 reached or exceeded the level of controls.

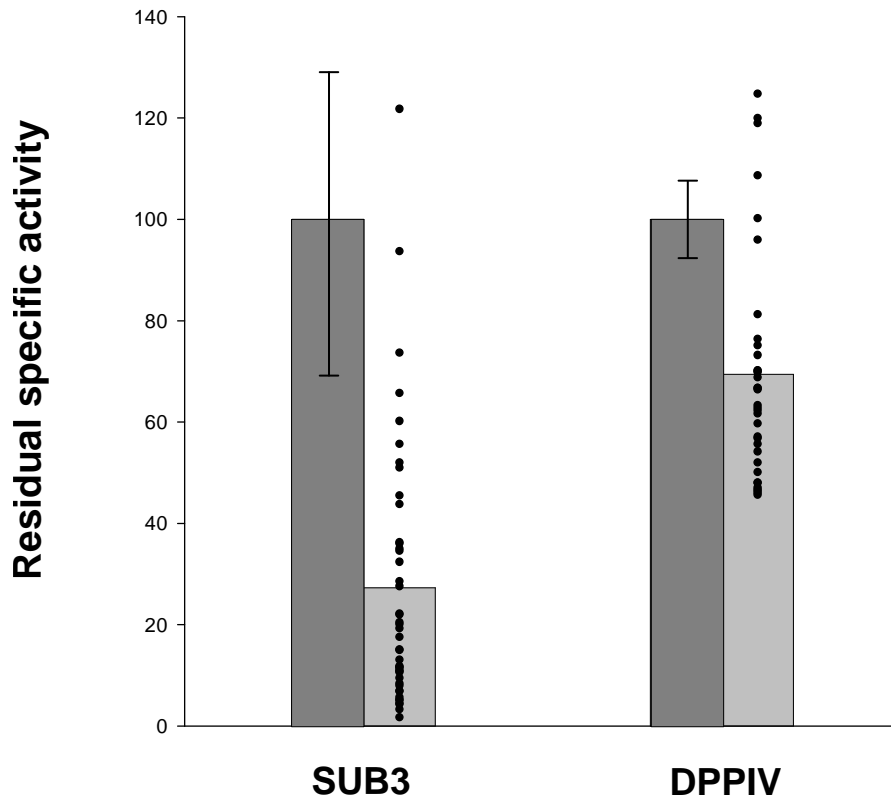


Figure 2: Residual specific enzymatic activity (activity units/ $\mu\text{g}$  total protein) in culture supernatants of pS1-*SUB3* and pS1-*DPPIV* transformants. Left dark bars represent mean specific activity of control pSilent-1 transformants, arbitrarily set to 100 (+/- Standard Deviation). Right light bars correspond to mean residual specific activity of silenced transformants, each particular value being represented by a point.

Gene expression levels of *SUB3* and *DPPIV* were then quantified in twelve pSilent1-*SUB3* and seven pSilent1-*DPPIV* transformants, relatively to expression levels of at least two pSilent-1 control strains. Tested transformants were called S-*SUB3*-1 to S-*SUB3*-12 and S-*DPPIV*-1 to S-*DPPIV*-7; they were selected among those that showed the lowest residual specific activities. S-*SUB3*-1 to S-*SUB3*-12 showed a decreased mRNA level compared to controls, while only S-*DPPIV*-5 among the S-*DPPIV* tested strains exceeded the level of controls. The lowest observed values were 2% and 1.5% expression for S-*SUB3*-11 and S-*DPPIV*-2, respectively. As for enzymatic activities, a whole range of inhibition levels was observed. Residual expression levels are shown in figure 3, in parallel with corresponding specific enzymatic activities.

PCR detection of the *HPH* gene and of the hairpin constructs were positive in S-*SUB3*-1 to S-*SUB3*-12 and 3/3 other pS1-*SUB3* transformants, as well as S-*DPPIV*-1 to S-*DPPIV*-7 and 3/3 other pS1-*DPPIV* transformants. PCR amplification of endogenous *SUB3* and *DPPIV*

complete coding sequences was performed for both genes on all these silenced transformants, and confirmed the integrity of these genes.

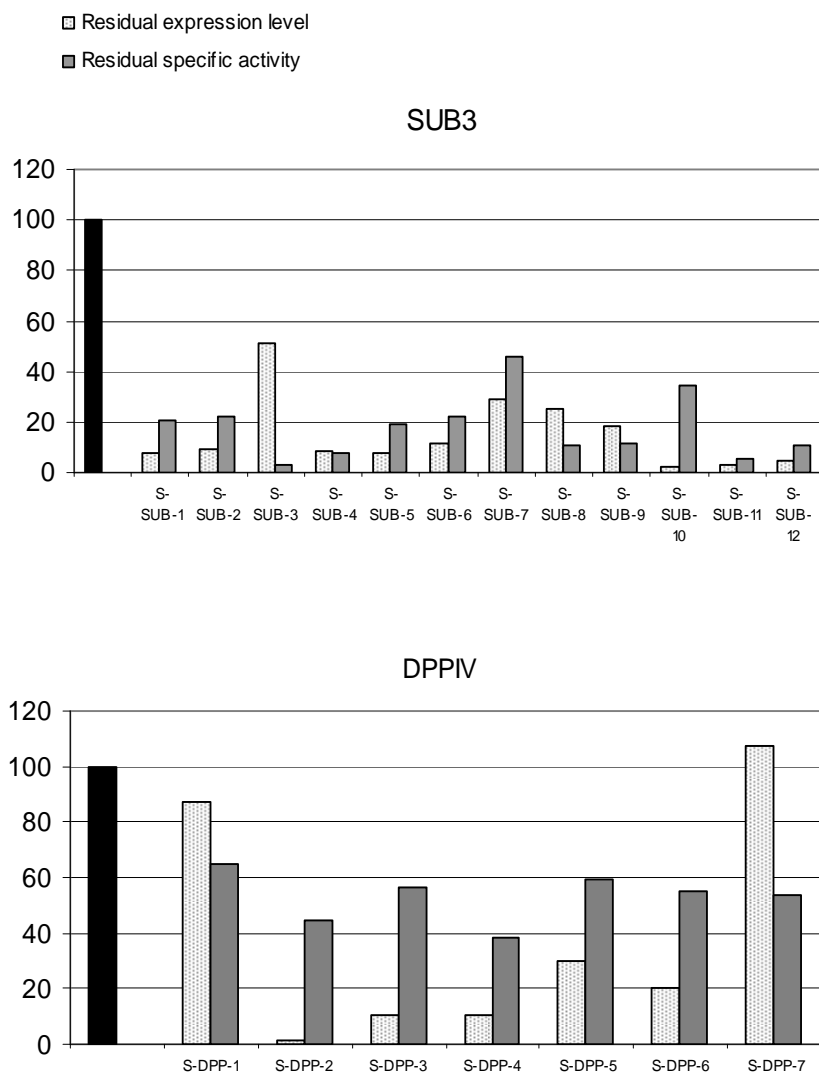


Figure 3: Residual expression levels and residual specific enzymatic activities of pS1-*SUB3* and pS1-*DPPIV* *M. canis* transformants, relatively to control strains. Left dark bar represents mean specific activity of control pSilent-1 transformants, arbitrarily set to 100.

## Discussion

Here we report RNA-mediated down-regulation of two *M. canis* genes, *SUB3* and *DPPIV*, potentially involved in fungal virulence. This is believed to be the first evaluation of RNA silencing methodology in dermatophytes. The rate of inhibition was highly variable from one transformant to another using the same plasmid construction. However, selected transformants with reduced enzymatic activity showed a reduced transcription level of targeted

genes. The observed variability of RNA silencing in *M. canis*, regarding phenotypic effects and mRNA depletion, is in agreement with the results of many other comparable trials involving fungi (Liu *et al.*, 2002; Kadotani *et al.*, 2003; Mouyna *et al.*, 2004; Rappleye *et al.*, 2004). Variability in the degree of interference is explained, at least partially, by the unpredictable fate of the transforming DNA in the fungal cell, and silencing efficiency is not correlated with the number copies of the construct which are integrated in the genome (Rappleye *et al.*, 2004; Yamada *et al.*, 2007). Results of molecular analyses of silenced fungal strains suggest that interference strength depends on the region of integration of the construct, that can be non permissive to transcription, and by rearrangements undergone by the construct (Liu *et al.*, 2002; Goldoni *et al.*, 2004).

Similarly to the findings of Tanguay *et al.* (2006), who showed that transcripts levels do not necessarily correlate with the inhibition of a particular phenotype, no strong correlation was observed between real time RT-PCR and enzymatic assay results. This can be explained by slight differences in the growth stage of the transformants, because growth rate is difficult to normalize in the case of slow growing fungi, such as *M. canis*. Furthermore, ratios between RNA level and enzymatic activity can vary during fungal growth, e.g. RNA levels can remain constant while active enzyme is accumulating in the culture supernatant.

The overall inhibition was more efficient on *SUB3* than on *DPPIV*. Global efficiency of RNA hairpin-mediated silencing in filamentous fungi can vary from one silencing construct to the other (Goldoni *et al.*, 2004; Tanguay *et al.*, 2006). For instance, the length of the inverted repeats or the characteristics of the spacer region, influence the yield of highly or fully silenced transformants. In addition, besides the fact that some fungi seem to lack the RNAi-like machinery (Nakayashiki *et al.*, 2006), not all fungal species respond equally to the same silencing strategy (Nakayashiki *et al.*, 2005). Relation between mRNA levels and phenotypic changes is particular to each target gene and may cause apparent variation in interference efficacy. Each target gene is also more or less amenable to repression, and some genes simply cannot be silenced in this way (Fraser *et al.*, 2000). In the case of *DPPIV*, it cannot be excluded that a still unidentified enzyme that is secreted in the conditions of this study cleaves the synthetic substrate used to assay enzymatic activity. It should however have little or no sequence homology to *DPPIV*, since the corresponding gene was shown to have no paralogue in the *M. canis* genome (manuscript in preparation), as it was in *T. rubrum* (Monod *et al.*, 2005). Under that hypothesis, the efficiency of *DPPIV* silencing would be underestimated.

A single gene fragment corresponding to a conserved region is able to interfere with the



expression of a whole gene family (Zoraghi & Seebeck, 2002; Miki *et al.*, 2005) or with multiple gene copies (Yamada *et al.*, 2007). However, studies demonstrate that siRNA (small interfering RNA)-mediated silencing can be efficient despite the presence of several mismatches (Saxena *et al.*, 2003; Jackson *et al.*, 2003). In the absence of clear knowledge of sequence matching requirements for RNA-mediated inhibition in fungi, we didn't design our *SUB3* construct with maximal homology to other family members, nor check for possible attenuation of other *SUBs*. Not less than seven *SUB* genes were found in the *T. rubrum* genome (Jousson *et al.*, 2004b) and the genome of other dermatophyte species so far encodes the same set of secreted proteases. Although the protein sequence of each ortholog is highly conserved across species, the level of secretion of each enzyme is species specific (Giddey *et al.*, 2007). Therefore, the residual activity of S-*SUB3* transformants could also be due to other subtilisins secreted by *M. canis* in minor amounts.

RNA silencing in *M. canis* and other dermatophytes can offer several advantages over conventional gene disruption or replacement. First, it circumvents the need of homologous recombination, which is arduous, and requires long flanking sequences. Disruption methods also require transforming uninuclear cells, which are not easily available in some dermatophyte species, including *M. canis*. By contrast, RNA-based silencing is able to induce the degradation of all similar mRNAs in a multinuclear cell, even if only one nucleus expresses the silencing construct (de Jong *et al.*, 2006). Secondly, this strategy allows the investigation of essential genes, whose disruption would be lethal. An inducible promoter may be used, to obtain conditional knockdown. A third advantage of the method is the possibility of achieving simultaneous silencing of several genes with a single conserved fragment, or with a single chimeric construct (Fitzgerald *et al.*, 2004). Therefore, RNA inhibition could be particularly helpful in dermatophytes, which possess large gene families coding for proteases.

A recent study (Henry *et al.*, 2007) showed that in *A. fumigatus*, the inhibitory construct could be lost or modified over successive transfers. Consequently, the evolution of silencing in *M. canis* transformants has to be further verified in the context of each intended downstream application. However, all the data presented here, including PCR detection of the integrated constructs, were collected with transformants which underwent two transfers. Indeed, all transformants were grown a first time in liquid medium in order to confirm hygromycin resistance. Then, they were transferred in distilled water for short-term conservation and picked from this stock for each subsequent analysis. These data give a first indication about the stability of our constructs. In conclusion, RNA-mediated gene silencing in dermatophytes like

in other fungi can be used as an alternative to disruption methods, for the functional investigation of available and forthcoming genome sequence information.

## Acknowledgements

We thank Isabelle Mouyna and Anne Beauvais from the Institut Pasteur, Unité des *Aspergillus*, Paris, for technical and scientific advice. This work was supported by grant n° 3.4595.04 from Fonds de la Recherche Scientifique Médicale (FRSM). Sandy Vermout, Jérémy Tabart and Aline Baldo are recipients of a studentship of F.R.I.A. (Fonds pour la Formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture, rue d'Egmont 5, 1000 Bruxelles).

## References

Beauvais A, Monod M, Wyniger J, Debeaupuis JP, Grouzmann E, Brakch N, Svab J, Hovanessian AG & Latgé JP (1997) Dipeptidyl peptidase IV secreted by *Aspergillus fumigatus*, a fungus pathogenic to humans. *Infect Immun* **65**: 3042-3047.

Boonacker E & Van Noorden CJF (2003). The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur J Cell Biol* **82**: 53-73.

Brouta F, Descamps F, Monod M, Vermout S, Losson B & Mignon B (2002) Secreted metalloprotease gene family of *Microsporum canis*. *Infect Immun* **70**: 5676-5683.

de Jong JF, Deelstra HJ, Wosten HA & Lugones LG (2006). RNA-mediated gene silencing in monokaryons and dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Appl Environ Microbiol* **72**:1267-9.

Descamps F, Brouta F, Monod M, Zaugg C, Baar D, Losson B & Mignon B (2002) Isolation of a *Microsporum canis* gene family encoding three subtilisin-like proteases expressed *in vivo*. *J Invest Dermatol* **119**: 830-835.

Descamps F, Brouta F, Vermout S, Monod M, Losson B & Mignon B (2003) Recombinant expression and antigenic properties of a 31.5-kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **38**: 29-34.

- Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Maccheroni W Jr & Martinez-Rossi NM (2006) Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol* **55**: 1093-9.
- Ferreira-Nozawa MS, Silveira HC, Ono CJ, Fachin AL, Rossi A & Martinez-Rossi NM. (2006) The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail *in vitro*. *Med Mycol* **44**: 641-5.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA & Driver SE (1998) Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806-811.
- Fitzgerald A, Van Kan JA & Plummer KM (2004) Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. *Fungal Genet Biol* **41**: 963-71.
- Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M & Ahringer J (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* **408**: 325-330.
- Giddey K, Favre B, Quadroni M & Monod M (2007) Closely related dermatophyte species produce different patterns of secreted proteins. *FEMS Microbiol Lett* **267**: 95-101.
- Goldoni M, Azzalin G, Macino G & Cogoni C (2004) Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* **41**: 1016-1024.
- Gonzalez R, Ferrer S, Buesa J, Ramon D (1989) Transformation of the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* to hygromycin B resistance. *Infect Immun* **57**: 2923-5.
- Henry C, Mouyna I & Latge JP (2007) Testing the efficacy of RNA interference constructs in *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* **51**: 277-84.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G & Linsley PS (2003) Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* **21**: 635-637.

Jousson O, Lechenne B, Bontems O, Capoccia S, Mignon B, Barblan J, Quadroni M & Monod M (2004a) Multiplication of an ancestral gene encoding secreted fungalysin preceded species differentiation in the dermatophytes *Trichophyton* and *Microsporum*. *Microbiology* **150**: 301-10.

Jousson O, Lechenne B, Bontems O, Mignon B, Reichard U, Barblan J, Quadroni M & Monod M (2004b) Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. *Gene* **339**: 79-88.

Kadotani N, Nakayashiki H, Tosa Y & Mayama S (2003) RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 769-776.

Kumagai Y, Yagishita H, Yajima A, Okamoto T & Konishi K (2005) Molecular mechanism for connective tissue destruction by dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* **73**: 2655-2664.

Liu H, Cottrell TR, Pierini ML, Goldman WE & Doering TL (2002) RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* **160**: 463-470.

McCluskey K (2003) The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. *Adv Appl Microbiol* **52**: 245-262.

Mignon B, Swinnen M, Bouchara JP, Hofinger M, Nikkels A, Pierard G, Gerday C, Losson B (1998a) Purification and characterization of a 31.5 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporum canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. *Med Mycol* **36**: 395-404.

Mignon BR, Nikkels AF, Pierard GE & Losson BJ (1998b) The *in vitro* and *in vivo* production of a 31.5-kD keratinolytic subtilase from *Microsporum canis* and the clinical status in naturally infected cats. *Dermatology* **196**: 438-41.

Mignon B, Coignoul F, Leclipteux T, Focant C & Losson B (1999a) Histopathological pattern and humoral immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporum canis* in symptomatic and asymptomatic infected cats. *Med Mycol* **37**: 1-9.

Mignon B, Leclipteux T, Focant C, Nikkels A, Pierard G & Losson B (1999b) Humoral and cellular immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporium canis* in experimentally infected guinea pigs. *Med Mycol* **37**: 123-129.

Miki D, Itoh R & Shimamoto K (2005) RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiol* **138**: 1903-13.

Monod M, Léchenne B, Jousson O, Grand D, Zaugg C, Stöcklin R & Grouzmann E (2005) Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Microbiology* **151**: 145-155.

Mouyna I, Henry C, Doering TL & Latgé JP (2004) Gene Silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* **237**: 317-324.

Nakayashiki H (2005) RNA silencing in fungi: Mechanisms and applications. *FEBS lett* **579**: 5950-5957.

Nakayashiki H, Hanada S, Bao Quoc N, Kadotani N, Tosa Y & Mayama S (2005) RNA silencing as a tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genet Biol* **42**: 275-283.

Nakayashiki H, Kadotani N & Mayama S (2006) Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi. *J Mol Evol* **63**: 127-135.

Rappleye CA, Engle JT & Goldman WE (2004) RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for  $\alpha$ -(1,3)-glucan in virulence. *Mol Microbiol* **53**, 153-165.

Saxena S, Jonsson ZO & Dutta A (2003) Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem* **278**: 44312-44319.

Tanguay P, Bozza S & Breuil C (2006) Assessing RNAi frequency and efficiency in *Ophiostoma floccosum* and *O. piceae*. *Fungal Genet Biol* **43**: 804-12.

Weld RJ, Plummer KM, Carpenter MA & Ridgway HJ (2006) Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Res* **16**: 31-44.

Yagishta H, Kumagai Y, Konishi K, Takahashi Y, Aoba T & Yoshikawa M (2001) Histopathological studies on virulence of dipeptidyl aminopeptidase IV (DPPIV) of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse abscess model: use of a DPPIV-deficient mutant. *Infect Immun* **69**: 7159-7161.

Yamada T, Makimura K & Abe S (2006) Isolation, characterization, and disruption of *dnr1*, the *areA/nit-2*-like nitrogen regulatory gene of the zoophilic dermatophyte *Microsporum canis*. *Med Mycol* **44**: 243-52.

Yamada O, Ikeda R, Ohkita Y, Hayashi R, Sakamoto K & Akita O (2007) Gene silencing by RNA interference in the Koji mold *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 138-144.

Zoraghi R & Seebeck T (2002) The cAMP-specific phosphodiesterase TbPDE2 is an essential enzyme in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci* **99**: 4343-4348.



## **Chapitre 4**

### **Présentation synoptique des résultats**



## **1. ETUDE 1 : ESSAI DE VACCINATION DU COBAYE CONTRE LA DERMATOPHYTOSE A *M. CANIS* AU MOYEN D'UNE METALLOPROTEASE KERATINOLYTIQUE RECOMBINANTE DE 43,5 kDa (MEP3)**

Un vaccin expérimental anti-*M. canis* a été préparé en associant MEP3, obtenue sous forme recombinante dans la levure *Pichia pastoris* (rMEP3), à l'adjuvant de Freund. Le vaccin a été administré à des cobayes, par voie sous-cutanée, trois fois à 15 jours d'intervalle. La vaccination a induit une forte réponse en anticorps spécifiques, ainsi qu'une réponse lymphoproliférative envers MEP3. Toutefois, cette dernière est apparue comme transitoire, puisqu'elle n'était plus significative au moment de l'épreuve d'infection. Celle-ci a eu lieu 7 semaines après la dernière vaccination. L'évolution clinique de l'infection, ainsi que la croissance du champignon, ont été suivies de façon régulière et exprimées respectivement sous forme de scores clinique et mycologique attribués à chaque animal. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence entre les scores des animaux vaccinés et non vaccinés. La réponse en anticorps induite par l'infection chez les animaux non vaccinés s'est révélée nettement plus faible que celle induite par la vaccination ; la réponse lymphoproliférative observée après l'infection était d'intensité comparable chez les animaux vaccinés et non vaccinés. Le vaccin à base de rMEP3 n'a donc induit aucune protection, malgré l'induction d'une importante réponse humorale et le recrutement de cellules T spécifiques.

## **2. ETUDE 2 : ISOLEMENT ET CARACTERISATION DES GENES DE DIPEPTIDYL PEPTIDASES DE *MICROSPORUM CANIS* ; ETUDE DE LEUR EXPRESSION *IN VIVO* ET *IN VITRO*. PRODUCTION DES PROTEASES SOUS FORME RECOMBINANTE ET ETUDE DE LA REPONSE IMMUNE CELLULAIRE CUTANEE ENVERS LA DIPEPTIDYL PEPTIDASE V DE *M. CANIS***

Dans le but d'identifier de nouveaux immunogènes potentiels, et de compléter dans le même temps les connaissances relatives aux protéases sécrétées par *M. canis*, les gènes codant pour des dipeptidyl peptidases ont été identifiés. Deux gènes uniques, codant respectivement pour une DPPIV et une DPPV, ont été isolés, séquencés et caractérisés. Ils encodent des protéases à sérine de la famille S9, possédant un peptide signal de sécrétion mais pas de séquence pro-, et comprenant respectivement 775 et 726 acides aminés. Les deux protéases sont à 90% identiques à leurs orthologues isolés chez *T. rubrum*. Elles présentent également un important degré d'homologie avec les DPP d'*A. fumigatus*, qui ont été proposées comme facteurs de virulence. La DPPIV de *M. canis* présente un degré d'homologie significatif avec la DPPIV de la bactérie pathogène *Porphyromonas gingivalis*, qui est un facteur de virulence avéré, ainsi qu'avec le marqueur mammalien CD26, une molécule multifonctionnelle participant à de nombreux processus biologiques et immunologiques. Grâce à une technique de RT-PCR en temps réel, une importante augmentation de l'expression des deux DPP de *M. canis* a été mise en évidence lorsque le champignon est cultivé sur des milieux constitués de protéines de matrice extracellulaire, parmi lesquelles la kératine. L'expression des DPP a également été détectée *in vivo*, chez le chat et le cobaye infectés, par RT-PCR nichée. Les deux protéases ont été produites sous forme recombinante dans la levure *P. pastoris*, et y sont enzymatiquement actives. La masse moléculaire de la DPPV est de 83 kDa, tandis que la DPPIV apparaît sous forme d'un doublet de 95 et 98 kDa ; elles sont glycosylées à raison de 5 kDa et de 9 ou 12 kDa, respectivement. Les DPP recombinantes clivent les substrats préférentiels des enzymes de leurs sous-familles, ce qui correspond dans le cas de la DPPIV à une spécificité particulière pour les liens de type Pro-X. Alors qu'aucune des deux DPP de *M. canis* n'est à elle seule kératinolytique, l'implication de la DPPIV dans la digestion du réseau de kératine a été testée en utilisant le substrat Keratin Azure et des surnageants de culture de *M. canis* montrant une forte activité kératinolytique. La préincubation de ces surnageants avec un inhibiteur spécifique de DPPIV n'a eu aucun effet sur le niveau de solubilisation du substrat kératinisé. Ce résultat indique que l'intervention potentielle de

la DPPIV dans cette digestion a lieu uniquement en aval de la digestion par les endoprotéases. Enfin, dans le but d'évaluer la capacité de la DPPV d'induire une réponse cutanée de type DTH, sa forme recombinante a été utilisée comme antigène lors de tests d'intradermoréaction chez des cobayes précédemment infectés par *M. canis*. Aucune réponse DTH significative n'a été mise en évidence. Ce résultat contraste avec ceux obtenus chez l'homme infecté par *T. tonsurans* avec la DPPV de ce dermatophyte. Toutefois, dans ce cas, c'est la forme native de la protéine qui a été utilisée, plutôt qu'une forme recombinante potentiellement dépourvue des épitopes adéquats.

### **3. ETUDE 3 : MISE AU POINT D'UNE TECHNIQUE D'INACTIVATION GENIQUE PAR L'ARN CHEZ *MICROSPORUM CANIS*. CONSTRUCTION DE SOUCHES DEFICIENTES AU NIVEAU DE LA DIPEPTIDYL PEPTIDASE IV DE *M. CANIS*, ET DE SOUCHES DEFICIENTES AU NIVEAU D'UNE SUBTILASE KERATINOLYTIQUE DE 31,5 kDa (SUB3)**

L'expression des gènes *SUB3* et *DPPIV* de *M. canis* a été inhibée, de manière indépendante, au moyen de constructions intégratives codant pour un ARN en épingle à cheveux de séquence identique à un fragment du gène ciblé ; la taille respective de ces fragments était de 688 et 596 paires de bases. Il s'agit de la première mise en œuvre de cette méthodologie chez les dermatophytes. La technique employée dérive du phénomène d'« interférence à l'ARN » (*RNA interference, RNAi*), qui a lieu à proprement parler dans les cellules animales, mais équivaut à des voies similaires chez les autres types d'organismes, y compris les champignons. Pour chaque gène cible, les souches fongiques générées ont présenté des degrés d'inhibition variables, évalués par RT-PCR en temps réel et par mesure de l'activité enzymatique des protéines cibles dans les surnageants de culture des transformants. Les taux résiduels d'activité enzymatique et d'ARN messenger obtenus étaient respectivement de 3,3% et 2% pour *SUB3*, et de 45,6% et 1,5% pour *DPPIV*. La distribution régulière des taux d'inhibition génique entre 0% et plus de 95% est compatible avec les résultats d'études similaires en champignons filamenteux. En outre, dans le cas de l'atténuation de l'expression de *SUB3*, une analyse par électrophorèse SDS-PAGE du surnageant de culture d'une souche fortement inhibée montre la disparition de la bande correspondant à *SUB3*, mais aussi de celle correspondant à *SUB4*, ce qui constitue la preuve d'une inhibition simultanée de gènes homologues par un seul fragment interférant.

# **Chapitre 5**

## **Discussion générale**

Depuis la mise au point d'une ancienne génération de vaccins anti-dermatophytes, entiers ou faiblement caractérisés, très peu de progrès ont été enregistrés dans ce domaine. Ces vaccins, y compris ceux qui ont été commercialisés, n'ont pas donné la preuve à la fois d'une pleine efficacité, d'une protection de longue durée, et d'une absence totale d'effets secondaires. De plus, il s'agit exclusivement de vaccins vétérinaires, et, à notre connaissance, aucune étude concernant la vaccination anti-dermatophytes chez l'homme n'a été publiée. Seul un nombre limité de vaccins expérimentaux parfaitement caractérisés ont été testés chez l'animal. En ce qui concerne *M. canis*, outre l'essai utilisant MEP3 recombinante, décrit dans ce travail, un essai avec SUB3 recombinante a été réalisé (Descamps *et al.*, 2003b) ; parallèlement, la hsp60 de *T. mentagrophytes* a été évaluée en tant qu'immunogène vaccinal sous forme de protéine recombinante et de vaccin à ADN, chez le veau et le cobaye (Raska *et al.*, 2004). Dans les conditions expérimentales des essais réalisés, les vaccins à base de rMEP3 et rSUB3 se sont révélés clairement inefficaces, et ceux à base de hsp60 n'ont apporté qu'une protection partielle et inconstante. Ces vaccins étaient associés à l'adjuvant de Freund, un adjuvant ancien responsable d'effets secondaires, et ont été administrés par voie sous-cutanée ou intramusculaire.

La faiblesse des avancées dans le domaine des vaccins anti-dermatophytes est liée à celle des connaissances concernant la réponse immune induite par ces champignons. Celles-ci restent en effet élémentaires et lacunaires, surtout en comparaison des énormes progrès réalisés à ce sujet chez d'autres champignons pathogènes, comme *A. fumigatus* et *C. albicans*, qui ont fait l'objet de recherches intensives étant donné la menace mortelle qu'ils représentent (Romani, 2004).

L'efficacité d'un vaccin dépend principalement du pouvoir immunogène de la ou des sous-unités microbiennes qu'il contient, de la façon dont il est adjuvanté, et de sa voie d'administration. Dans le cas par exemple d'*A. fumigatus*, la nécessité d'agir sur les trois tableaux est mise en lumière par deux études ayant utilisé des protéases recombinantes comme candidats vaccinaux. Dans un modèle murin d'aspergillose invasive, Bozza et collaborateurs (2002) ont utilisé comme vaccins quatre allergènes, chaque fois seuls ou en association avec des oligonucléotides CpG (ODN), des agonistes TLR9, et administrés par voie nasale. Le vaccin composé de l'allergène Asp f 16 et d'ODNs a été le seul efficace, et a protégé près de 100% des souris vaccinées. L'allergène Asp f 3, qui n'a pas été protecteur lors de cette étude, a par contre permis un contrôle relatif de la maladie lors d'un autre essai en modèle murin (Ito *et al.*, 2006). Il était alors adjuvanté par une émulsion huileuse, le TiterMax®, et administré par voie sous-cutanée. Ainsi, les raisons de l'échec de la vaccination avec rMEP3 peuvent résider à

la fois dans les propriétés intrinsèques de MEP3 en tant qu'immunogène et dans celles de l'adjuvant utilisé, et l'influence de la voie d'administration doit également être envisagée. L'association entre ces facteurs détermine subtilement le type de réponse immune qui est induite et donc le niveau de protection obtenu.

Pour être efficace, tout vaccin doit d'abord activer des cellules mémoires. En effet, toute réponse immunitaire nécessite l'intervention de la CMI au moins sous forme de lymphocytes T auxiliaires (CD4+). La réponse lymphoproliférative *in vitro* obtenue envers rMEP3 suite à la vaccination témoigne du recrutement de ces cellules et de leur activation en cellules mémoires. Toutefois, cette réponse est retombée à un niveau basal au moment de l'épreuve d'infection, ce qui suggère que le vaccin n'a pas induit de mémoire immunitaire prolongée.

Le bras effecteur de l'immunité lors d'une dermatophytose naturelle est constitué par les phagocytes, suractivés par les lymphocytes Th1 dans le cadre d'une réaction inflammatoire, alors que les anticorps semblent ne pas être liés à l'élimination de l'infection. C'est pourquoi, traditionnellement, on considère que c'est une réponse effectrice cellulaire qui doit être induite par un vaccin anti-dermatophytes. Cependant, les nombreux travaux effectués sur les mycoses invasives à *C. albicans*, *A. fumigatus* et *C. neoformans*, qui, comme toutes les infections fongiques, sont naturellement la cible d'une réponse Th1 à effecteurs cellulaires, montrent que ce raisonnement est peut-être erroné. En effet, grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux, on a pu montrer que les sérums dirigés contre ces champignons sont non protecteurs en raison de la présence d'anticorps bloquants ou inhibiteurs, ou parce que les anticorps utiles y sont présents en trop faible quantité (Casadevall *et al.*, 2002). Ces découvertes ont d'ailleurs été le point de départ de la mise au point non seulement de plusieurs vaccins anti-fongiques expérimentaux efficaces basés entièrement sur l'immunité humorale (AMI, *antibody-mediated immunity*) (Cassone, 2007), mais aussi de stratégies d'immunisation passive dont l'une a abouti à la commercialisation d'un anticorps monoclonal recombinant destiné au traitement des candidoses invasives (Matthews *et al.*, 2003). En outre, si l'on fait abstraction des vaccins entiers, dont l'innocuité peut poser problème, tous les vaccins dont la médecine dispose à ce jour agissent essentiellement par le biais d'une réponse en anticorps (Cassone, 2007). Obtenir via la vaccination une réponse Th1 stimulant l'immunité cellulaire comme effecteur, qu'il s'agisse d'ailleurs de phagocytes ou de cellules T cytotoxiques (CD8+), est donc une tâche ardue (Cassone, 2007). C'est ainsi qu'actuellement, deux voies sont suivies pour le développement de vaccins anti-fongiques. La première consiste à induire des anticorps de spécificité et d'isotype adéquat pour obtenir une protection. La seconde s'en tient à la stimulation d'une réponse cellulaire Th1 mais en utilisant des approches novatrices telles que le transfert adoptif de

cellules dendritiques.

Malgré les taux élevés d'anticorps induits par rMEP3, ceux-ci ne sont pas protecteurs. Pourtant, même si les vaccins anti-fongiques les plus prometteurs actuellement utilisent des antigènes polysaccharidiques (Torosantucci *et al.*, 2005 ; Cassone et Torosantucci, 2006), il est possible de vacciner efficacement contre une infection fongique en stimulant la production d'anticorps dirigés contre une seule protéine, et, en particulier, contre une seule protéase. En effet, De Bernardis et collègues (2007) ont montré que des anticorps neutralisant la mannoprotéine MP65 ou la protéase aspartique sécrétée Sap2 de *C. albicans* permettent un contrôle efficace de l'infection vaginale chez le rat, en inhibant l'adhérence du champignon. Par contre, des anticorps dirigés contre une élastase d'*A. fumigatus* n'ont pas protégé les souris infectées contre une aspergillose invasive (Frosco *et al.*, 1994). Il est donc possible que MEP3, contrairement notamment à Sap2, ne soit pas un facteur indispensable à la virulence de *M. canis*.

En faisant appel à de nouvelles techniques de vaccination et à de nouveaux adjuvants, l'objectif de protection peut aussi être atteint via une réponse effectrice cellulaire. Dans un modèle murin de transplantation de cellules hématopoïétiques, permettant de créer un déséquilibre immunitaire au détriment de la réponse Th1, un vaccin à base de cellules dendritiques activées par des éléments fongiques et produisant de l'Il-12 permet d'orienter la population de lymphocytes T en cours de reconstitution dans le sens Th1. Ce type de vaccin restaure la résistance des souris transplantées vis-à-vis de l'infection par *A. fumigatus* (Bozza *et al.*, 2003) et par *C. albicans* (Bacci *et al.*, 2002). Une réponse de type Th1 peut aussi être engendrée par une seule protéine vaccinale. Cela a été suggéré dans le cas d'Asp f 3 (Ito *et al.*, 2006), qui induit ou non la production d'anticorps selon la façon dont elle est tronquée, mais qui conserve dans tous les cas ses effets protecteurs. De même, le vaccin à ADN à base d'hsp60 de *T. mentagrophytes* est nettement plus efficace que son équivalent sous forme de protéine associée à l'adjuvant de Freund, alors que, contrairement à ce dernier, il n'induit pas de réponse humorale (Raska *et al.*, 2004). Chez des souris partiellement protégées via la protéine Als1p de *C. albicans*, l'implication prépondérante de la réponse cellulaire en tant que réponse effectrice a été montrée, entre autres, par le succès obtenu en vaccinant des animaux déficients en lymphocytes B et par l'induction de réponses cutanées de type DTH (Ibrahim *et al.*, 2005). Enfin, le contrôle de l'aspergillose invasive chez la souris obtenu grâce à l'association d'Asp f 16 et d'ODNs (Bozza *et al.*, 2002) est lui aussi clairement lié à une réponse effectrice cellulaire, puisque les lymphocytes isolés de souris protégées sont de type Th1. Ce vaccin permet également de polariser dans le sens Th1 des cellules dendritiques, alors que les ODNs seuls



augmentent les capacités fongicides des neutrophiles et des macrophages. En outre, Asp f 16 induit *in vivo* des réactions DTH, non seulement chez des souris infectées par le champignon, mais aussi chez des souris naïves, quoique dans une moindre mesure. Un résultat similaire a été obtenu en pratiquant des tests cutanés avec rMEP3 chez le cobaye, mais aucune différence n'a pu être mise en évidence entre animaux infectés et naïfs (résultats non publiés); la réponse obtenue ne peut donc être attribuée à un recrutement des cellules mémoires responsables de l'immunité spécifique anti-*M. canis*.

Il est de plus en plus évident que la voie d'entrée d'un immunogène a une influence substantielle sur la réponse induite, et ce notamment parce qu'elle détermine les capacités de *homing* des cellules T. Celles-ci dépendent à la fois du microenvironnement cytokinique généré au niveau du site d'infection, et des molécules d'adhésion exprimées par ces cellules. Il se peut donc que l'utilisation de la voie d'immunisation cutanée déclenche les signaux indispensables à l'établissement d'une réponse anti-dermatophytes efficace. Les lymphocytes T spécifiques pourraient ainsi être programmés de façon à exprimer des ligands ou des récepteurs dirigeant leur migration vers la peau, comme par exemple le CLA (*Cutaneous Lymphocyte Antigen*) (Sieling *et al.*, 2007).

Les recherches concernant la vaccination anti-dermatophytique devront donc, pour progresser, s'inspirer des résultats obtenus avec les autres champignons pathogènes. Cependant, elles devront également tenir compte de deux particularités propres aux dermatophytes, à savoir leur localisation superficielle au niveau de l'épiderme, et leur comportement de parasites obligatoires par opposition au caractère opportuniste de *Candida* et *Aspergillus*.

Plusieurs arguments indiquent que la DPPV de *M. canis* est un candidat immunogène intéressant. Le caractère immunogène de la DPPV d' *A. fumigatus* n'est plus à démontrer, puisque cette protéine n'est autre que le « *chymotryptic antigen* » utilisé depuis longtemps pour le diagnostic sérologique de l'aspergillome (Kobayashi *et al.*, 1993 ; Beauvais *et al.*, 1997a). Les anticorps dirigés contre elle reconnaissent uniquement la partie polypeptidique de la protéine, qui par ailleurs ne contient pas le motif galactofuranosyl immunogène porté par la plupart des glycoprotéines d'*A. fumigatus* et par ses mannanes de paroi (Kobayashi *et al.*, 1993 ; Latgé, 1999). Ces anticorps sont potentiellement protecteurs, car des souris immunisées à l'aide de conidies et survivant à l'infection produisent des anticorps reconnaissant de façon monospécifique la DPPV; leur profil isotypique correspond à une réponse de type Th2 (Latgé, 1999). Cependant, aucune étude n'a été entreprise afin de confirmer et d'expliquer ce caractère protecteur.

La DPPV d'*A. fumigatus* induit aussi des réactions DTH (Hebart *et al.*, 2002). Celle de *T. tonsurans*, l'antigène Tri t 4, induit des réactions cutanées de type DTH chez les patients éliminant efficacement l'infection, mais des réactions IH chez ceux infectés de façon persistante (Woodfolk *et al.*, 1996). Jusqu'à présent, la seule autre protéine ayant montré cette propriété particulière est également produite par un dermatophyte ; il s'agit de Tri r 2, la subtilase SUB6 de *T. rubrum* (Woodfolk *et al.*, 1998). Les différentes réponses induites par Tri r 2 correspondent en réalité à la reconnaissance d'épitopes différents par les cellules T des patients, et l'épitope P5, reconnu chez les patients guéris d'une infection aiguë, a été proposé comme candidat vaccinal potentiel (Woodfolk *et al.*, 2000). Les protéases DPPV et SUB6 constituent donc des antigènes clés dans l'orientation de la réponse immune anti-dermatophytes. Lors de notre expérience, la DPPV de *M. canis* n'a cependant induit aucune réaction cutanée significative chez des cobayes infectés expérimentalement. Des tests cutanés effectués chez l'homme avec la DPPV de *T. rubrum* (Tri r 4) ont donné le même résultat négatif (Woodfolk *et al.*, 1998). Etant donné que les deux expériences ont pour point commun d'avoir utilisé les DPPV sous forme recombinante, produites par *Pichia pastoris*, l'explication la plus plausible est que les modifications post-traductionnelles effectuées par la levure modifient l'immunogénicité de la protéine. En effet, les nombreuses modifications post-traductionnelles des protéines – y compris la glycosylation – influencent grandement le *processing* des antigènes et leur capacité à être présentés en association avec le CMH ; de plus, beaucoup de ces modifications ont été identifiées au niveau de peptides effectivement présentés, et sont le plus souvent responsables de la reconnaissance spécifique par les cellules T (Rudd *et al.*, 2001 ; Engelhard *et al.*, 2006). Dans le cas particulier de *P. pastoris* en tant que système d'expression, plusieurs études rapportent des modifications d'antigénicité en rapport avec la reconnaissance par des anticorps (van Oort *et al.*, 2004), mais aucune ne concerne la reconnaissance par les cellules T. Alternativement, l'absence de réaction DTH observée pourrait être attribuée à des différences entre les DPPV des différentes espèces de dermatophytes. Cependant, cela semble peu probable étant donné le haut pourcentage d'identité qui existe entre elles. Par conséquent, de façon inattendue, la DPPV recombinante de *M. canis* pourrait devenir un outil pour identifier les déterminants antigéniques qui confèrent à la protéine native ses propriétés immunogènes. Il serait par exemple intéressant de tester les propriétés immunogéniques de la protéase entièrement déglycosylée et donc débarrassée de potentiels écrans formés par des sucres et masquant des motifs antigéniques potentiellement importants.

Les propriétés antigéniques des DPPIV fongiques restent quant à elles peu connues, si ce n'est que celle d'*A. fumigatus* est reconnue spécifiquement par les sera de personnes atteintes

d'aspergillome (Beauvais *et al.*, 1997b). La DPPIV de *M. canis* est homologue à la DPPIV mammalienne (ou CD26) et partage avec elle des caractéristiques enzymatiques. Or, cette protéine multifonctionnelle est, entre autres, capable d'activer les cellules T, en particulier CD4+, et ce via différents mécanismes (Pacheco *et al.*, 2005). Il est donc possible, comme cela a été envisagé pour la DPPIV d'*A. fumigatus* (Beauvais *et al.*, 1997b), que les DPPIV des dermatophytes influencent de façon non spécifique la stimulation des lymphocytes T.

Comme cela a été suggéré pour *T. rubrum* (Monod *et al.*, 2005), les DPP de *M. canis* pourraient jouer un rôle dans la digestion fine des peptides générés suite à l'action de ses endoprotéases sur le réseau de kératine. Cela est particulièrement vrai pour la DPPIV qui, en tant que POP, peut agir sur les goulots d'étranglement que représentent les liens Pro-X. L'action synergique des POP et des aminopeptidases lors du découpage des peptides en acides aminés libres et dipeptides a été démontrée pour la DPPIV d'*Aspergillus oryzae* (Byun *et al.*, 2001) et la protéase PepX de *Lactococcus lactis* (Bouchier *et al.*, 1999). Cependant, chez ces organismes saprophytes utilisés dans l'industrie alimentaire, si la suppression de l'activité POP change la composition des produits fermentés, elle ne ralentit pas la croissance sur protéines complexes, même riches en proline (Mayo *et al.*, 1993 ; Doumas *et al.*, 1998). Par analogie, ceci suggère que la DPPIV des dermatophytes n'est peut-être pas essentielle pour la digestion terminale de la kératine. De plus, certains champignons filamenteux exceptionnellement pathogènes, dont *Aspergillus niger*, sont totalement dépourvus de DPPIV extracellulaire (Jalving *et al.*, 2005).

Par contre, les propriétés de la DPPIV de *M. canis*, et son homologie avec une série de facteurs de virulence avérés, permettent d'envisager pour elle un rôle direct *in vivo* dans la pathogenèse de l'infection. Sur base de leur séquence en acides aminés, de nombreux peptides biologiques, y compris des chémokines et cytokines, sont potentiellement clivables par la protéine mammalienne CD26. Pour une partie d'entre eux, ce clivage ainsi que ses effets sur les différents processus biologiques et immunologiques a été bien démontré (Bauvois *et al.*, 1992 ; Mentlein, 1999 ; Van Damme *et al.*, 1999 ; Lambeir *et al.*, 2001). La DPPIV d'*A. fumigatus* peut elle aussi cliver certains peptides biologiques (Beauvais *et al.*, 1997b). De plus, la DPPIV membranaire de *Porphyromonas gingivalis* est un facteur de virulence altérant la mobilité des cellules inflammatoires ; elle participe également à la destruction des tissus conjonctifs, probablement en association avec des MMP (*matrix metalloproteinases*) présentes chez l'hôte (Yagishita *et al.*, 2001, Kumagai *et al.*, 2005). Cette protéase n'a pourtant à elle seule aucune activité protéolytique envers les protéines de matrice extracellulaire. Par contre, la POP vacuolaire Tc80 de *Trypanosoma cruzi*, qui est nécessaire à l'entrée du parasite dans les

cellules hôtes, possède cette particularité et peut dégrader le collagène et la fibronectine (Bastos *et al.*, 2005). Cette liste de fonctions attribuées aux POP dans le cadre de processus infectieux n'est pas exhaustive et leur investigation réserve peut-être d'importantes découvertes. En effet, chez *Streptococcus agalactiae*, une étude à l'échelle du génome a montré que l'inactivation du gène *PepX* atténuait nettement le pouvoir pathogène de la bactérie, ce qui a amené à considérer la POP encodée par ce gène comme une cible thérapeutique potentielle pour les maladies à streptocoques (Jones *et al.*, 2000 ; Rigolet *et al.*, 2005). Toutes ces données montrent que la DPPIV de *M. canis* peut être suspectée d'intervenir à plusieurs niveaux dans le processus infectieux ; elle pourrait notamment interférer via son action enzymatique avec la réponse immune de l'hôte.

Les DPP de *M. canis* remplissent donc plusieurs rôles potentiels, et, afin de leur attribuer de façon formelle une ou plusieurs fonctions dans la relation hôte-champignon, il sera nécessaire de construire des souches déficientes au niveau de ces protéases.

L'inactivation génique via l'ARN, ou RMGS (*RNA-mediated gene silencing*), est un phénomène naturel existant sous différentes formes chez les différents organismes (Hutvagner et Zamore, 2002 ; Bagasra et Prilliman, 2004). Toutes les voies cellulaires d'inactivation génique regroupées sous ce nom sont déclenchées par un ARN « aberrant », le plus souvent un ARN double brin ; elles mènent à l'inhibition de l'expression des gènes de séquence correspondante, par divers mécanismes dont le principal est la dégradation enzymatique des ARN messagers. Le terme « interférence ARN » (*RNAi*, *RNA interference*) est largement utilisé dans ce cadre bien qu'il désigne spécifiquement la voie d'inactivation via un ARN double brin dans les systèmes animaux. Les petits ARNs interférants (*siRNAs*, *small interfering RNAs*), qui sont des intermédiaires de l'interférence ARN, d'une taille de 20 à 25 bp environ, sont largement exploités pour induire cette cascade dans les cellules animales (Dallas et Vlassov, 2006 ; Pei et Tuschl, 2006), y compris dans un but thérapeutique (Aagaard et Rossi, 2007). Le RMGS existe également chez la plupart des champignons (Nakayashiki, 2005), et des siRNAs sont générés par la cellule fongique en tant qu'intermédiaires dans la cascade d'inactivation (Kadotani *et al.*, 2003 ; Nicolas *et al.*, 2003 ; Goldoni *et al.*, 2004). Pourtant, même si plusieurs équivalents de gènes de la machinerie RNAi ont été identifiés chez les champignons, les mécanismes qui président à l'inhibition restent largement à éclaircir ; de plus, il semble exister une grande hétérogénéité entre les voies d'interférence chez les différentes espèces fongiques (Nakayashiki *et al.*, 2006). L'élucidation de ces mécanismes mènera sans doute à la mise au point de techniques de RMGS plus puissantes que celle utilisée dans notre étude, la seule

fonctionnant actuellement chez les champignons filamenteux. En attendant, pour la première fois, l'inhibition de l'expression de gènes via un ARN en épingle à cheveux a été appliquée avec succès chez un dermatophyte.

Les avantages potentiels de la méthodologie RNAi chez les champignons filamenteux sont nombreux. Elle évite la nécessité d'obtenir des recombinaisons homologues, elle peut fonctionner dans le cas d'entités multinucléées - telles les macroconidies et les syncytia formés par les filaments fongiques - dont un seul noyau est transformé, et elle autorise l'investigation de gènes essentiels. De plus, l'inhibition obtenue avec cette technique peut être contrôlée par l'intermédiaire d'un promoteur inductible. Mais dans le cas particulier des dermatophytes, pourvus d'importantes familles de gènes comme les MEP et les SUB, l'avantage qui est peut-être le plus intéressant est la possibilité d'inhiber plusieurs gènes avec une seule construction, et qui plus est avec un seul fragment génique conservé. Chez le protozoaire *Trypanosoma brucei*, les 3 membres de la famille des gènes TbpDE2 ont pu être inhibés simultanément grâce à un seul fragment hautement conservé présentant respectivement 91,8% et 99,6% d'identité avec chacun de ses paralogues (Zoraghi et Seebeck, 2002). Cependant, se demander quel pourcentage d'identité entre le fragment interférant et une séquence cible est requis pour obtenir une inhibition est une question biaisée. En effet, c'est très probablement au niveau des siRNA que se détermine le ciblage ou non d'une séquence homologue. Ceci est en accord avec les résultats obtenus par Miki et collaborateurs (2005), qui ont réduit simultanément l'expression des 7 gènes de la famille *OsRac* chez le riz *Oryza sativa*. Dans cette étude, le fragment interférant, issu de *OsRac1*, présentait 21 à 49 bases identiques consécutives par rapport à ses paralogues, ce qui correspondait à 72-82% d'identité ; par contre, chacun de ces gènes a été inactivé indépendamment des autres par des fragments inhibiteurs présentant entre eux des suites de 4 à 8 bases identiques seulement pour des taux d'identité de 44 à 52%. Dans notre étude, la construction interférante visant SUB3 a également touché SUB4. La séquence du gène *SUB4* de *M. canis* n'est pas connue, mais, chez *T. rubrum*, les séquences de *SUB3* et *SUB4* sont identiques à 66%. Si l'on compare les séquences d'intérêt chez les gènes *SUB* de *M. canis*, on observe une suite de 16 et 8 nucléotides identiques au maximum, respectivement, entre *SUB1/SUB3* et *SUB2/SUB3*, pour des taux d'identité de 58 et 46% ; il serait donc surprenant d'obtenir pour ces gènes une inactivation croisée. Il est pourtant bien trop simpliste de prédire l'inhibition d'un gène à partir de ces chiffres, étant donné que d'une part, un seul siRNA peut être très peu efficace, et que de l'autre, un siRNA peut être inhibiteur malgré la présence de plusieurs mésappariements (Jackson *et al.*, 2003 ; Saxena *et al.*, 2003); en réalité, la prédiction du pouvoir inhibiteur des ARN interférants est sans doute très complexe. Toutefois, dans le cas

de l'inhibition simultanée des gènes *OsRac*, l'interférence n'est jamais aussi efficace qu'avec un taux d'identité de 100%, et elle l'est d'autant plus que ce taux est élevé.

Dans l'état actuel de son développement, l'inactivation génique par l'ARN chez les champignons filamenteux comporte aussi certains désavantages. Notamment, la stabilité de l'intégration des constructions inhibitrices peut constituer un problème important. Dans une étude récente menée avec des souches inhibées d'*A. fumigatus*, Henry et collaborateurs (2007) ont évalué la fréquence de perte de la construction à 50% lors de chaque transfert, et ce indépendamment de l'usage ou non d'un milieu sélectif. Ce phénomène est probablement dû à l'instabilité inhérente aux répétitions inverses (IR, *inverted repeats*) de fragments d'ADN. En effet, dans tous les types de génomes, on constate que les motifs palindromiques présentent une forte tendance à la délétion et augmentent la fréquence des recombinaisons impliquant les régions adjacentes (Gordenin *et al.*, 1993 ; Leach, 1994 ; Lobachev *et al.*, 2007). Les mécanismes sous-jacents sont probablement complexes, mais selon le modèle actuellement accepté, la structure en épingle à cheveux formée durant le processus de réplication par l'appariement intra-brin des deux bras du motif est soit reconnue et excisée par des nucléases spécifiques, soit exclue suite au glissement de la polymérase vers l'autre brin ou l'autre extrémité du palindrome. Le règne fongique n'échappe pas à la règle : chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'instabilité des IR est bien établie. Une étude utilisant toute une gamme de séquences palindromiques a montré que leur caractère instable était directement proportionnel à la taille des IR et inversement proportionnel à la taille de la séquence espaçante (*spacer*) (Lobachev *et al.*, 1998) ; d'après les résultats de cette étude, les tailles de ces éléments dans la construction utilisée chez *M. canis* dans notre étude sont compatibles avec une telle instabilité.

Certaines solutions peuvent être envisagées pour éviter cet écueil. Le vecteur pSilent-dual mis au point par Nakayashiki (2006) pourrait en être une, car il génère un ARN double brin en utilisant deux promoteurs orientés en sens opposé autour d'un seul fragment cloné. Chez le champignon dimorphe *Histoplasma capsulatum*, l'expression stable d'une structure en épingle à cheveux a été obtenue grâce à l'ajout de séquences télomériques (Rappleve *et al.*, 2004); l'incorporation de telles séquences a également amélioré la stabilité des constructions interférantes chez *Cryptococcus neoformans* (Liu *et al.*, 2002). Les séquences télomériques permettent une réplication autonome de la construction inhibitrice sous forme de plasmide linéaire, et évitent donc de devoir faire appel à une intégration dans le génome fongique (Woods et Goldman, 1993). De telles séquences ont été mises en évidence chez différents champignons filamenteux, et peuvent y maintenir des fragments d'ADN en tant qu'entités

génétiques autonomes même si elles sont d'origine hétérologue (Ruiz-Diez, 2002). Enfin, une troisième solution pourrait consister à faire exprimer par les champignons des siRNAs, bien que leur utilisation directe chez ces organismes n'ait jamais été rapportée. Même s'ils sont exprimés via une construction en épingle à cheveux, leur petite taille pourrait assurer une meilleure stabilité.

L'investigation par RMGS de gènes qui ne correspondent pas à un caractère phénotypique directement visualisable, comme c'est le cas pour *SUB3* et *DPPIV* chez *M. canis*, peut être grandement facilitée par la co-inactivation, sous le contrôle du même promoteur, du gène cible et d'un gène marqueur. Même si une corrélation parfaite entre les taux d'inhibition des deux gènes semble impossible à obtenir, une première indication de la puissance de l'interférence chez chaque transformant constitue un outil précieux permettant une présélection rapide. Chez *C. neoformans*, l'inhibition du gène *ADE2* donne aux colonies une coloration rose pouvant être utilisée comme marqueur endogène (Liu *et al.*, 2002); la pigmentation naturelle par la mélanine pourrait également servir de système rapporteur chez certaines espèces fongiques (Fitzgerald *et al.*, 2004 ; Tanguay *et al.*, 2006). Aucun gène capable de jouer ce rôle n'a été identifié chez les dermatophytes, mais des souches de ces champignons pourraient être transformées avec un transgène exprimant une protéine « sentinelle », constituant un marqueur dont l'intensité varie graduellement selon l'efficacité de son inhibition. Un marquage efficace du niveau d'inactivation par l'ARN a été réalisé grâce à la GFP (*Green Fluorescent Protein*) chez différents champignons (Fitzgerald *et al.*, 2004 ; de Jong *et al.*, 2006 ; Marion *et al.*, 2006 ; Krajaejun *et al.*, 2007). Janus et collaborateurs (2007) ont quant à eux montré que lors de co-inhibition, l'intensité de la coloration par la protéine DsRed était grossièrement corrélée avec le niveau d'expression du gène de l'isopénicilline N synthase d'*Acremonium chrysogenum*, et le niveau de la production de céphalosporine C qui en découle. Chez les dermatophytes, l'utilisation d'un transgène comme marqueur est réalisable, comme en témoigne la construction de souches de *T. mentagrophytes* exprimant la GFP (Kaufman *et al.*, 2004).

L'utilisation du RMGS chez les dermatophytes n'en est sans doute qu'à ses débuts. En effet, la réalisation de tests de virulence envers des plantes, notamment avec des souches atoxigéniques de *Fusarium* et d'*Aspergillus* spp. (McDonald *et al.*, 2005), ainsi que, chez la souris, les premières évaluations de la pathogénicité de souches déficientes d'*H. capsulatum* (Bohse et Woods, 2007), montrent que l'utilisation de cette méthodologie reste très prometteuse pour élucider la pathogenèse des infections fongiques.

# **Chapitre 6**

## **Résumé et conclusions**



Un vaccin anti-*M. canis*, constitué de la métalloprotéase sécrétée MEP3 sous sa forme recombinante associée à l'adjuvant de Freund, a été testé en immunisant des cobayes par voie sous-cutanée. Suite à l'épreuve d'infection, aucune atténuation des symptômes, ni de l'invasion par le champignon, n'a été observée, et ce malgré l'induction d'une réponse humorale et le recrutement de lymphocytes T. Des résultats similaires ont été obtenus par d'autres auteurs, avec la subtilase sécrétée SUB3 de *M. canis* et la hsp60 de *T. mentagrophytes*. Or, le succès d'un vaccin résulte à la fois des propriétés intrinsèques du ou des immunogènes qu'il contient, et de la stimulation sélective par son adjuvant des acteurs de la réponse immune. Deux options sont donc offertes pour de nouvelles recherches dans le domaine de la vaccination anti-*M. canis* et anti-dermatophytes. La première consiste à poursuivre la dissection de la réponse immune spécifique en étudiant les propriétés immunogènes de composants particuliers. Même si l'élimination naturelle d'une infection fongique relève généralement d'une réponse effectrice cellulaire de type Th1, cette perspective va bien au-delà de la recherche d'un facteur activant des lymphocytes Th1, ou rappelant une réponse de type DTH au niveau cutané. En effet, il est évident actuellement que des anticorps de spécificité bien choisie peuvent être totalement protecteurs contre une infection fongique. En outre, il ne faut pas perdre de vue que l'élément fongique de base déterminant une réponse immune adéquate est l'épitope. Le répertoire d'épitopes générés à partir d'une protéase recombinante peut d'ailleurs être modifié par rapport à son homologue natif, comme cela est suspecté pour rDPPV chez *M. canis*. Ce phénomène peut engendrer une altération des propriétés immunogènes natives, mais *a contrario*, une protéase recombinante ainsi modifiée peut devenir un outil pour identifier des motifs antigéniques d'intérêt.

La seconde voie possible vers un vaccin sûr et pleinement efficace est l'utilisation de nouveaux adjuvants orientant la réponse immune de la même façon qu'une infection naturelle. Chez *A. fumigatus*, des oligonucléotides CpG associés à une protéine recombinante ont permis d'obtenir une protection, en stimulant plusieurs composants de la réponse cellulaire de type Th1. La vaccination à base de cellules dendritiques polarisées par un contact avec *A. fumigatus* s'est également montrée prometteuse, cette technique pouvant être assimilée à un adjuvant de nouvelle génération. Il est bien entendu que ces deux voies de recherche ne s'excluent pas mutuellement, et qu'un travail mené dans les deux directions sera sans doute nécessaire pour atteindre le but recherché.

Les DPPIV et V de *M. canis* ont été caractérisées au niveau moléculaire, et exprimées sous forme recombinante active. Leurs propriétés ainsi que celles de différentes protéases homologues laissent supposer qu'elles jouent un rôle universel dans la digestion de substrats protéiques complexes, y compris les structures kératinisées, en aval de la digestion par les endoprotéases

sécrétées. Elles pourraient en plus avoir acquis une ou plusieurs fonctions spécialisées dans le cadre de la relation hôte-parasite. Dans le cas de la DPPIV, l'une de ces fonctions pourrait être la modulation de la réponse immune via le clivage de cytokines ou de chémokines, étant donné notamment sa similitude avec la DPPIV mammalienne ou CD26. Parallèlement, les DPP sont peut-être simplement des immunogènes importants. La DPPIV sécrétée par *M. canis* pourrait également intervenir dans l'adhérence aux protéines de matrice extracellulaire, ou encore dans la dégradation des tissus en association avec des protéases de l'hôte, comme cela a été démontré chez *Porphyromonas gingivalis*.

Plusieurs perspectives sont donc ouvertes quant à l'investigation de la fonction des DPP des dermatophytes, et certaines pourront être rencontrées grâce aux formes recombinantes de ces protéines. Cependant, pour elles comme pour tous les autres facteurs fongiques susceptibles de contribuer à la pathogenèse des dermatophytoses, la construction de souches déficientes est un passage obligé vers la démonstration formelle de cette contribution. Ceci est maintenant réalisable rapidement, au moyen de constructions exprimant des ARN double brin interférants, même si de nombreuses améliorations peuvent sans doute être apportées à cette technique. Les souches déficientes au niveau de SUB3 et potentiellement des autres SUB, ainsi que celles déficientes au niveau de la DPPIV, seront prochainement évaluées quant à leur comportement dans un modèle d'épiderme félin reconstitué mis au point dans notre laboratoire (Tabart *et al.*, 2007).

**Chapitre 7**  
**Bibliographie**

- Aagaard L, Rossi JJ. RNAi therapeutics: Principles, prospects and challenges. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; **59**: 75-86.
- Abramo F, Vercelli A, Mancianti F. Two cases of dermatophytic pseudomycetoma in the dog: an immunohistochemical study. *Vet Dermatol* 2001; **12**: 203-207.
- Ackerman LJ. Canine Fungal Skin Diseases. In: Nesbitt GH, Ackerman LJ (Eds). *Canine and feline dermatology: diagnosis and treatment*. Veterinary Learning systems, Trenton, New Jersey, 1998a: 224-245.
- Ackerman LJ. Feline Fungal Skin Diseases. In: Nesbitt GH, Ackerman LJ (Eds). *Canine and feline dermatology: diagnosis and treatment*. Veterinary Learning systems, Trenton, New Jersey, 1998b: 425-441.
- Agrawal A, Pulendran B. Anthrax lethal toxin: a weapon of multisystem destruction. *Cell Mol Life Sci* 2004; **61**: 2859-2865.
- Ahy R, Hay RJ, Del Palacia A, Galimberti R. Epidemiology of *tinea capitis*. *Med Mycol* 2000; **38** (Suppl 1): 183-188.
- Aljabre SH, Richardson MD, Scott EM, Shankland GS. Germination of *Trichophyton mentagrophytes* on human *stratum corneum in vitro*. *J Med Vet Mycol* 1992; **30**: 145-152.
- Aljabre SH, Richardson MD, Scott EM, Rashid A, Shankland GS. Adherence of arthroconidia and germlings of anthropophilic and zoophilic varieties of *Trichophyton mentagrophytes* to human corneocytes as an early event in the pathogenesis of dermatophytosis. *Clin Exp Dermatol* 1993; **18**: 231-235.
- Arrese JE, Piérard-Franchimont C, Piérard GE. Les teignes du cuir chevelu d'ici et d'ailleurs : quand la prévention est à géographie variable. *Rev Med Liège* 2003; **58**: 388-391.
- Bacci A, Montagnoli C, Perruccio K, Bozza S, Gaziano R, Pitzurra L, Velardi A, d'Ostiani CF, Cutler JE, Romani L. Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation. *J Immunol* 2002; **168**: 2904-2913.
- Bachrach G, Banai M, Fishman Y, Bercovier H. Delayed-type hypersensitivity activity of the *Brucella* L7/L12 ribosomal protein depends on posttranslational modification. *Infect Immun* 1997; **65**: 267-271.
- Bagasra O, Prilliman KR. RNA interference: the molecular immune system. *J Mol Histol* 2004; **35**: 545-553.
- Bastos IM, Grellier P, Martins NF, Cadavid-Restrepo G, de Souza-Ault MR, Augustyns K, Teixeira AR, Schrevel J, Maigret B, da Silveira JF, Santana JM. Molecular, functional and structural properties of the prolyl oligopeptidase of *Trypanosoma cruzi* (POP Tc80), which is required for parasite entry into mammalian cells. *Biochem J* 2005; **388**: 29-38.
- Bauvois B, Sanceau J, Wietzerbin J. Human U937 cell surface peptidase activities: characterization and degradative effect on tumor necrosis factor-alpha. *Eur J Immunol* 1992; **22**: 923-930.

- Beausejour A, Grenier D, Goulet JP, Deslauriers N. Proteolytic activation of the interleukin-1beta precursor by *Candida albicans*. *Infect Immun* 1998; **66**: 676-81.
- Beauvais A, Monod M, Debeaupuis JP, Diaquin M, Kobayashi H, Latge JP. Biochemical and antigenic characterization of a new dipeptidyl-peptidase isolated from *Aspergillus fumigatus*. *J Biol Chem* 1997a; **272**: 6238-6244.
- Beauvais A, Monod M, Wyniger J, Debeaupuis JP, Grouzmann E, Brakch N, Svab J, Hovanessian AG, Latge JP. Dipeptidyl-peptidase IV secreted by *Aspergillus fumigatus*, a fungus pathogenic to humans. *Infect Immun* 1997b; **65**: 3042-3047.
- Becker JM, Naider F. Fungal peptide transport as a drug delivery system. In: Taylor M, Amidon G (Eds). *Peptide-based drug design: controlling transport and metabolism*. American Chemical Society, Washington, DC, 1995: 369-384.
- Ben-Ziony Y, Arzi B. Use of lufenuron for treating fungal infections of dogs and cats: 297 cases (1997-1999). *J Am Vet Med Assoc* 2000; **217**: 1510-1513.
- Ben-Ziony Y, Arzi B. Updated information for treatment of fungal infections in cats and dogs. *J Am Vet Med Assoc* 2001; **218**: 1718.
- Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, Vecchi A, Mantovani A, Levitz SM, Romani L. The contribution of the Toll-like/IL-1 receptor superfamily to innate and adaptive immunity to fungal pathogens *in vivo*. *J Immunol* 2004; **172**: 3059-3069.
- Berg JC, Hamacher KL, Roberts GD. Pseudomycetoma caused by *Microsporium canis* in an immunosuppressed patient: a case report and review of the literature. *J Cutan Pathol* 2007; **34**: 431-434.
- Berk SH, Penneys NS, Weinstein GD. Epidermal activity in annular dermatophytosis. *Arch Dermatol* 1976; **112**: 485-488.
- Blake JS, Dahl MV, Herron MJ, Nelson RD. An immunoinhibitory cell wall glycoprotein (mannan) from *Trichophyton rubrum*. *J Invest Dermatol* 1991a; **96**: 657-661.
- Blake JS, Cabrera RM, Dahl MV, Herron MJ, Nelson RD. Comparison of the immunoinhibitory properties of cell wall mannan glycoproteins from *Trichophyton rubrum* and *Microsporium canis*. *J Invest Dermatol* 1991b; **96**: 601.
- Blasi E, Mucci A, Neglia R, Pezzini F, Colombari B, Radzioch D, Cossarizza A, Lugli E, Volpini G, Del Giudice G, Peppoloni S. Biological importance of the two Toll-like receptors, TLR2 and TLR4, in macrophage response to infection with *Candida albicans*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005; **44**: 69-79.
- Bohse ML, Woods JP. RNA interference-mediated silencing of the YPS3 gene of *Histoplasma capsulatum* reveals virulence defects. *Infect Immun* 2007; **75**: 2811-2817.
- Bond R, Pocknell AM, Tozet CE. Pseudomycetoma caused by *Microsporium canis* in a Persian cat: lack of response to oral terbinafine. *J Small Anim Pract* 2001; **42**: 557-560.
- Boonacker E, Van Noorden CJ. The multifunctional or moonlighting protein CD26/DPPIV. *Eur*

*J Cell Biol* 2003; **82**: 53-73.

Borman AM, Campbell CK, Fraser M, Johnson EM. Analysis of the dermatophyte species isolated in the British Isles between 1980 and 2005 and review of worldwide dermatophyte trends over the last three decades. *Med Mycol* 2007; **45**: 131-141.

Bouchier PJ, FitzGerald RJ, O'Cuinn G. Hydrolysis of alphas1- and beta-casein-derived peptides with a broad specificity aminopeptidase and proline specific aminopeptidases from *Lactococcus lactis subsp. cremoris* AM2. *FEBS Lett* 1999; **445**: 321-324.

Bozza S, Gaziano R, Lipford GB, Montagnoli C, Bacci A, Di Francesco P, Kurup VP, Wagner H, Romani L. Vaccination of mice against invasive aspergillosis with recombinant *Aspergillus* proteins and CpG oligodeoxynucleotides as adjuvants. *Microbes Infect* 2002; **4**: 1281-1290.

Bozza S, Perruccio K, Montagnoli C, Gaziano R, Bellocchio S, Burchielli E, Nkwanyuo G, Pitzurra L, Velardi A, Romani L. A dendritic cell vaccine against invasive aspergillosis in allogeneic hematopoietic transplantation. *Blood* 2003; **102**: 3807-3814.

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

Brasch J, Sterry W. Immunophenotypical characterization of inflammatory cellular infiltrates in *tinea*. *Acta Derm Venereol* 1992; **72**: 345-347.

Bratberg AM, Solbakk IT, Gyllensvaan C, Bredahl LK, Lund A. Efficacy of an inactivated and a live bovine ringworm vaccine in an experimental challenge study (abstr), in *Proceedings Annu Meet Am Acad Vet Dermatol* 1999; **15**: 113-114.

Bredahl LK, Bratberg AM, Solbakk IT, Lund A. Efficacy of an experimental *Microsporium canis* vaccine in farmed foxes (abstr). *Vet Dermatol* 2000; **11** (suppl 1): 39.

Brik A, Wong CH. HIV-1 protease: mechanism and drug discovery. *Org Biomol Chem* 2003; **1**: 5-14.

Brilhante RS, Cavalcante CS, Soares-Junior FA, Cordeiro RA, Sidrim JJ, Rocha MF. High rate of *Microsporium canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: epidemiological and diagnostic features. *Mycopathologia* 2003; **156**: 303-308.

Bromuro C, La Valle R, Sandini S, Urbani F, Ausiello CM, Morelli L, Fe d'Ostiani C, Romani L, Cassone A. A 70-kilodalton recombinant Heat Shock protein of *Candida albicans* is highly immunogenic and enhances systemic murine candidiasis. *Infect Immun* 1998; **66**: 2154-2162.

Bromuro C, Torosantucci A, Chiani P, Conti S, Polonelli L, Cassone A. Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated Candidiasis in recipients of a *Candida albicans* vaccine. *Infect Immun* 2002; **70**: 5462-5470.

Brouta F, Descamps F, Fett T, Losson B, Gerday C, Mignon B. Purification and characterization of a 43.5 kDa keratinolytic metalloprotease from *Microsporium canis*. *Med Mycol* 2001; **39**: 269-275.

Brouta F, Descamps F, Monod M, Vermout S, Losson B, Mignon B. Secreted metalloprotease

- gene family of *Microsporium canis*. *Infect Immun* 2002; **70**: 5676-5683.
- Brouta F, Descamps F, Vermout S, Monod M, Losson B, Mignon B. Humoral and cellular immune response to a *Microsporium canis* recombinant keratinolytic metalloprotease (r-MEP3) in experimentally infected guinea pigs. *Med Mycol* 2003; **41**: 495-501.
- Byun T, Kofod L, Blinkovsky A. Synergistic action of an X-prolyl dipeptidyl aminopeptidase and a non-specific aminopeptidase in protein hydrolysis. *J Agric Food Chem* 2001; **49**: 2061-2063.
- Cafarchia C, Romito D, Capelli G, Guillot J, Otranto D. Isolation of *Microsporium canis* from the hair coat of pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis tinea corporis*. *Vet Dermatol* 2006; **17**: 327-331.
- Calderon RA, Hay RJ. Cell-mediated immunity in experimental murine dermatophytosis. II. Adoptive transfer of immunity to dermatophyte infection by lymphoid cells from donors with acute or chronic infections. *Immunology* 1984; **53**: 465-472.
- Calderon RA, Hay RJ. Fungicidal activity of human neutrophils and monocytes on dermatophyte fungi, *Trichophyton quinckeanum* and *Trichophyton rubrum*. *Immunology* 1987; **61**: 289-295.
- Calderon RA, Shennan GI. Susceptibility of *Trichophyton quinckeanum* and *Trichophyton rubrum* to products of oxidative metabolism. *Immunology* 1987; **61**: 283-288.
- Campos MR, Russo M, Gomes E, Almeida SR. Stimulation, inhibition and death of macrophages infected with *Trichophyton rubrum*. *Microbes Infect* 2006; **8**: 372-379.
- Carlotti DN, Pin D. Aspects cliniques et histopathologiques, diagnostic différentiel et traitements des dermatophytoses chez les carnivores domestiques. *Ann Méd Vét* 2002; **146**: 85-96.
- Casadevall A. Antibody immunity and invasive fungal infections. *Infect Immun* 1995; **63**: 4211-4218.
- Casadevall A, Feldmesser M, Pirofski LA. Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2002; **5**: 386-391.
- Cassone A. Fungal vaccines and vaccination : problems and perspectives. In : Brown GD, Netea MG (Eds). *Immunology of fungal infections*. Springer, Heidelberg, 2007: 465-485.
- Cassone A, Torosantucci A. Opportunistic fungi and fungal infections: the challenge of a single, general antifungal vaccine. *Expert Rev Vaccines* 2006; **5**: 859-867.
- Chen C. The use of terbinafine for the treatment of dermatophytosis. *Vet Derm* 2000; **12** (Suppl 1): 41.
- Cleary PP, Matsuka YV, Huynh T, Lam H, Olmsted SB. Immunization with C5a peptidase from either group A or B streptococci enhances clearance of group A streptococci from intranasally infected mice. *Vaccine* 2004; **22**: 4332-4341.

- Colombo S, Cornegliani L, Vercelli A. Efficacy of itraconazole as a combined continuous/pulse therapy in feline dermatophytosis: preliminary results in nine cases. *Vet Dermatol* 2001; **12**: 347-350.
- Comoy EE, Capron A, Typhronitis G. *In vivo* induction of type 1 and 2 immune responses against protein antigens. *Int Immunol* 1997; **9**: 523-531.
- Dahl MV. Immunological resistance to dermatophyte infections. *Adv Dermatol* 1987; **2**: 305-320.
- Dahl MV. Suppression of immunity and inflammation by products produced by dermatophytes. *J Am Acad Dermatol* 1993; **28**: S19-S23.
- Dahl MV, Carpenter R. Polymorphonuclear leukocytes, complement, and *Trichophyton rubrum*. *J Invest Dermatol* 1986; **86**: 138-141.
- Dahl MV, Grando SA. Chronic dermatophytosis: what is special about *Trichophyton rubrum*? *Adv Dermatol* 1994; **9**: 97-111.
- Dallas A, Vlassov AV. RNAi: a novel antisense technology and its therapeutic potential. *Med Sci Monit* 2006; **12**: RA67-RA74.
- Davies RR, Zaini F. *Trichophyton rubrum* and the chemotaxis of polymorphonuclear leucocytes. *Sabouraudia* 1984; **22**: 65-71.
- De Bernardis F, Liu H, O'Mahony R, La Valle R, Bartollino S, Sandini S, Grant S, Brewis N, Tomlinson I, Basset RC, Holton J, Roitt IM, Cassone A. Human domain antibodies against virulence traits of *Candida albicans* inhibit fungus adherence to vaginal epithelium and protect against experimental vaginal candidiasis. *J Infect Dis* 2007; **195**: 149-157.
- DeBoer DJ, Moriello KA. Humoral and cellular immune responses to *Microsporum canis* in naturally occurring feline dermatophytosis. *J Med Vet Mycol* 1993; **31**: 121-132.
- DeBoer DJ, Moriello KA. The immune response to *Microsporum canis* induced by a cell wall vaccine. *Vet Dermatol* 1994; **5**: 47-55.
- DeBoer DJ, Moriello KA. Clinical update on feline dermatophytosis-Part I. *The Compendium* 1995a; **17**: 1197-1203.
- DeBoer DJ, Moriello KA. Investigations of a killed dermatophyte cell-wall vaccine against infection with *Microsporum canis* in cats. *Res Vet Sci* 1995b; **59**: 110-113.
- DeBoer DJ, Moriello KA, Cooley AJ. Immunological reactivity to intradermal dermatophyte antigens in cats with dermatophytoses. *Vet Dermatol* 1991; **2**: 59-67.
- DeBoer DJ, Moriello KA, Blum JL, Volk LM, Bredahl LK. Safety and immunologic effects after inoculation of inactivated and combined live-inactivated dermatophytosis vaccines in cats. *Am J Vet Res* 2002; **63**: 1532-1537.
- DeBoer DJ, Moriello KA, Blum JL, Volk LM. Effects of lufenuron treatment in cats on the establishment and course of *Microsporum canis* infection following exposure to infected cats. *J*



*Am Vet Med Assoc* 2003; **222**: 1216-1220.

DeBoer DJ, Moriello KA, Volk LM, Schenker R, Steffan J. Lufenuron and terbinafine for treatment of *Microsporium canis* infections in a feline model. *Vet Dermatol* 2004; **15** (Suppl 1): 7-8.

De Hoog GS, Tan CS, Wintermans, RGF: CBS Course in Vertebrate Mycopathology. Centraal Bureau voor Schimmelculturen, Baarn, 1989.

de Jong JF, Deelstra HJ, Wosten HA, Lugones LG. RNA-mediated gene silencing in monokaryons and dikaryons of *Schizophyllum commune*. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 1267-1269.

Descamps F, Brouta F, Monod M, Zaugg C, Baar D, Losson B, Mignon B. Isolation of a *Microsporium canis* gene family encoding three subtilisin-like proteases expressed *in vivo*. *J Invest Dermatol* 2002; **119**: 830-835.

Descamps F, Brouta F, Vermout S, Monod M, Losson B, Mignon B. Recombinant expression and antigenic properties of a 31.5-kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporium canis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003a; **38**: 29-34.

Descamps FF, Brouta F, Vermout SM, Willame C, Losson BJ, Mignon BR. A recombinant 31.5 kDa keratinase and a crude exo-antigen from *Microsporium canis* fail to protect against a homologous experimental infection in guinea pigs. *Vet Dermatol* 2003b; **14**: 305-312.

De Vroey C. Epidemiology of ringworm (dermatophytosis). *Seminars in Dermatology* 1985; **4**: 185-200.

Dillon S, Agrawal A, Van Dyke T, Landreth G, McCauley L, Koh A, Maliszewski C, Akira S, Pulendran B. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses *in vivo*, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J Immunol* 2004; **172**: 4733-4743.

Dolenc-Voljc M. Dermatophyte infections in the Ljubljana region, Slovenia, 1995-2002. *Mycoses* 2005; **48**: 181-186.

Doumas A, van den Broek P, Affolter M, Monod M. Characterization of the prolyl dipeptidyl peptidase gene (dppIV) from the koji mold *Aspergillus oryzae*. *Appl Environ Microbiol* 1998; **64**: 4809-4815.

Duek L, Kaufman G, Ulman Y, Berdicevsky I. The pathogenesis of dermatophyte infections in human skin sections. *J Infect* 2004; **48**: 175-180.

Elad D, Segal E. Immunogenicity in guinea-pigs of a crude ribosomal fraction from *Microsporium canis*. *Vaccine* 1994; **12**: 134-138.

Engel M, Stossel E, Castiglione K, Schwerdtner N, Wagner M, Bolcskei P, Rollinghoff M, Stenger S. Induction of TNF in human alveolar macrophages as a potential evasion mechanism of virulent *Mycobacterium tuberculosis*. *J Immunol* 2002; **168**: 1328-1337.

Engelhard VH, Altrich-Vanlith M, Ostankovitch M, Zarling AL. Post-translational

- modifications of naturally processed MHC-binding epitopes. *Curr Opin Immunol* 2006; **18**: 92-97.
- Esquenazi D, de Souza W, Alviano CS, Rozental S. The role of surface carbohydrates on the interaction of microconidia of *Trichophyton mentagrophytes* with epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003; **35**: 113-123.
- Esquenazi D, Alviano CS, de Souza W, Rozental S. The influence of surface carbohydrates during in vitro infection of mammalian cells by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Res Microbiol* 2004; **155**: 144-153.
- Ferreira-Nozawa MS, Silveira HC, Ono CJ, Fachin AL, Rossi A, Martinez-Rossi NM. The pH signaling transcription factor PacC mediates the growth of *Trichophyton rubrum* on human nail in vitro. *Med Mycol* 2006; **44**: 641-645.
- Fachin AL, Ferreira-Nozawa MS, Maccheroni W Jr, Martinez-Rossi NM. Role of the ABC transporter TruMDR2 in terbinafine, 4-nitroquinoline N-oxide and ethidium bromide susceptibility in *Trichophyton rubrum*. *J Med Microbiol* 2006; **55**: 1093-1099.
- Fenner A, Karle J. Therapeutic vaccination against dermatophytosis in horses with Insol ® Dermatophyton – results of a field-study in eleven German counties. *Prakt Tierarzt* 2000; **81**: 574-578.
- Ferreiro L. Etiopathogénie des infections à *Microsporum canis*. Etude d'une exoprotéase kératolytique. PhD thesis, Université Paris XII, 1995.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; **391**: 806-811.
- Fitzgerald A, Van Kan JA, Plummer KM. Simultaneous silencing of multiple genes in the apple scab fungus, *Venturia inaequalis*, by expression of RNA with chimeric inverted repeats. *Fungal Genet Biol* 2004; **41**: 963-971.
- Fradin C, Mavor AL, Weindl G, Schaller M, Hanke K, Kaufmann SH, Mollenkopf H, Hube B. The early transcriptional response of human granulocytes to infection with *Candida albicans* is not essential for killing but reflects cellular communications. *Infect Immun* 2007; **75**: 1493-1501.
- Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J. Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 2000; **408**: 325-330.
- Froeliger EH, Carpenter BE. NUT1, a major nitrogen regulatory gene in *Magnaporthe grisea*, is dispensable for pathogenicity. *Mol Gen Genet* 1996; **251**: 647-656.
- Frosco MB, Chase T, Macmillan JD. The effect of elastase-specific monoclonal and polyclonal antibodies on the virulence of *Aspergillus fumigatus* in immunocompromised mice. *Mycopathologia* 1994; **125**: 65-76.
- 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.

- Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J* 2005; **24**: 1277-1286.
- Giddey K, Favre B, Quadroni M, Monod M. Closely related dermatophyte species produce different patterns of secreted proteins. *FEMS Microbiol Lett* 2007a; **267**: 95-101.
- Giddey K, Monod M, Barblan J, Potts A, Waridel P, Zaugg C, Quadroni M. Comprehensive analysis of proteins secreted by *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton violaceum* under *in vitro* conditions. *J Proteome Res* 2007b; publication on line.
- Girardin H, Latgé JP. DNA extraction and quantitation. In: Maresca B, Kobayashi GS (Eds). *Molecular Biology of Pathogenic fungi: A Laboratory Manual*. Telos Press, New York, 1994: 5-9.
- Goldoni M, Azzalin G, Macino G, Cogoni C. Efficient gene silencing by expression of double stranded RNA in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet Biol* 2004; **41**: 1016-1024.
- Goldstein JM, Banbula A, Kordula T, Mayo JA, Travis J. Novel extracellular x-prolyl dipeptidyl-peptidase (DPP) from *Streptococcus gordonii* FSS2: an emerging subfamily of viridans Streptococcal x-prolyl DPPs. *Infect Immun* 2001; **69**: 5494-5501.
- Gonzalez R, Ferrer S, Buesa J, Ramon D. Transformation of the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* to hygromycin B resistance. *Infect Immun* 1989; **57**: 2923-2925.
- Gordenin DA, Lobachev KS, Degtyareva NP, Malkova AL, Perkins E, Resnick MA. Inverted DNA repeats: a source of eukaryotic genomic instability. *Mol Cell Biol* 1993; **13**: 5315-5322.
- Gordon PJ, Bond R. Efficacy of a live attenuated *Trichophyton verrucosum* vaccine for control of bovine dermatophytosis. *Vet Rec* 1996; **139**: 395-396.
- Grando SA, Hostager BS, Herron MJ, Dahl MV, Nelson RD. Binding of *Trichophyton rubrum* mannan to human monocytes *in vitro*. *J Invest Dermatol* 1992a; **98**: 876-880.
- Grando SA, Herron MJ, Dahl MV, Nelson RD. Binding and uptake of *Trichophyton rubrum* mannan by human epidermal keratinocytes: a time-course study. *Acta Derm Venereol* 1992b; **72**: 273-276.
- Green F 3rd, Weber JK, Balish E. The thymus dependency of acquired resistance to *Trichophyton mentagrophytes* dermatophytosis in rats. *J Invest Dermatol* 1983; **81**: 31-38.
- Gregurek-Novak T. Effect of infection with *Trichophyton mentagrophytes varietas interdigitale* on phagocytosis in humans. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2004; **18**: 160-163.
- Gross TL, Ihrke PJ, Walder EJ. Feline dermatophytosis. In: Reinhardt RW (Ed). *Veterinary Dermatopathology. A macroscopic and microscopic evaluation of canine and feline skin disease*. Mosby Year Book, Saint-Louis, 1992: 241-243.
- Gudding R, Lund A. Immunoprophylaxis of bovine dermatophytosis. *Can Vet J* 1995; **36**: 302-306.

- Gudding R, Naess B. Vaccination of cattle against ringworm caused by *Trichophyton verrucosum*. *Am J Vet Res* 1986; **47**: 2415-2417.
- Guillot J, Latié L, Deville M, Halos L, Chermette R. Evaluation of the dermatophyte test medium RapidVet-D. *Vet Dermatol* 2001; **12**: 123-127.
- Guillot J, Malandain E, Jankowski F, Rojzner K, Fournier C, Touati F, Chermette R, Seewald W, Schenker R. Evaluation of the efficacy of oral lufenuron combined with topical enilconazole for the management of dermatophytosis in catteries. *Vet Rec* 2002; **150**: 714-718.
- Hase CC, Finkelstein RA. Bacterial extracellular zinc-containing metalloproteases. *Microbiol Rev* 1993; **57**: 823-837.
- Hauser M, Narita V, Donhardt AM, Naider F, Becker JM. Multiplicity and regulation of genes encoding peptide transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Membr Biol* 2001; **18**: 105-112.
- Hay RJ. Fungal Infections. In : Jacobs PH, Nall L. (Eds). Fungal Disease. Biology, Immunology and Diagnosis. Marcel Dekker, New York, 1997: 209-218.
- Hay RJ, Calderon RA, Mackenzie CD. Experimental dermatophytosis in mice: correlation between light and electron microscopic changes in primary, secondary and chronic infections. *Br J Exp Pathol* 1988; **69**: 703-716.
- Hebart H, Bollinger C, Fisch P, Sarfati J, Meisner C, Baur M, Loeffler J, Monod M, Latge JP, Einsele H. Analysis of T-cell responses to *Aspergillus fumigatus* antigens in healthy individuals and patients with hematologic malignancies. *Blood* 2002; **100**: 4521-4528.
- Henry C, Mouyna I, Latge JP. Testing the efficacy of RNA interference constructs in *Aspergillus fumigatus*. *Curr Genet* 2007; **51**: 277-284.
- Hensel M, Arst HN Jr, Aufauvre-Brown A, Holden DW. The role of the *Aspergillus fumigatus* *areA* gene in invasive pulmonary aspergillosis. *Mol Gen Genet* 1998; **258**: 553-557.
- Hnilica KA, Medleau L. Evaluation of topically applied enilconazole for the treatment of dermatophytosis in a Persian cattery. *Vet Dermatol* 2002; **13**: 23-28.
- Hutvagner G, Zamore PD. RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* 2002; **12**: 225-232.
- Ikuta K, Shibata N, Blake JS, Dahl MV, Nelson RD, Hisamichi K, Kobayashi H, Suzuki S, Okawa Y. NMR study of the galactomannans of *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. *Biochem J* 1997; **323**: 297-305.
- Ibrahim AS, Spellberg BJ, Avenissian V, Fu Y, Filler SG, Edwards JE Jr. Vaccination with recombinant N-terminal domain of Als1p improves survival during murine disseminated candidiasis by enhancing cell-mediated, not humoral, immunity. *Infect Immun* 2005; **73**: 999-1005.
- Imamura T, Travis J, Potempa J. The biphasic virulence activities of gingipains: activation and inactivation of host proteins. *Curr Protein Pept Sci* 2003; **4**: 443-450.

- Ito JI, Lyons JM, Hong TB, Tamae D, Liu YK, Wilczynski SP, Kalkum M. Vaccinations with recombinant variants of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 3 protect mice against invasive aspergillosis. *Infect Immun* 2006; **74**: 5075-5084.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS. Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nat Biotechnol* 2003; **21**: 635-637.
- Jalving R, Godefrooij J, Veen WJ, van Ooyen AJ, Schaap PJ. Characterisation of the *Aspergillus niger* dapB gene, which encodes a novel fungal type IV dipeptidyl aminopeptidase. *Mol Genet Genomics* 2005; **273**: 319-325.
- Janus D, Hoff B, Hofmann E, Kück U. An efficient fungal RNA-silencing system using the DsRed reporter gene. *Appl Environ Microbiol* 2007; **73**: 962-970.
- Jaton-Ogay K, Suter M, Cramer R, Falchetto R, Fatih A, Monod M. Nucleotide sequence of a genomic and a cDNA clone encoding an extracellular alkaline protease of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* 1992; **71**: 163-168.
- Jaton-Ogay K, Paris S, Huerre M, Quadroni M, Falchetto R, Togni G, Latge JP, Monod M. Cloning and disruption of the gene encoding an extracellular metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* 1994; **14**: 917-928.
- Jensen JM, Pfeiffer S, Akaki T, Schroder JM, Kleine M, Neumann C, Proksch E, Brasch J. Barrier function, epidermal differentiation, and human beta-defensin 2 expression in *tinea corporis*. *J Invest Dermatol* 2007; **127**: 1720-1727.
- Jones HE. Immune response and host resistance of humans to dermatophyte infection. *J Am Acad Dermatol* 1993; **28**: S12-S18.
- Jones HE, Reinhardt JH, Rinaldi MG. Acquired immunity to dermatophytes. *Arch Dermatol* 1974; **109**: 840-848.
- Jones AL, Knoll KM, Rubens CE. Identification of *Streptococcus agalactiae* virulence genes in the neonatal rat sepsis model using signature-tagged mutagenesis. *Mol Microbiol* 2000; **37**: 1444-1455.
- Jousson O, Lechenne B, Bontems O, Capoccia S, Mignon B, Barblan J, Quadroni M, Monod M. Multiplication of an ancestral gene encoding secreted fungalysin preceded species differentiation in the dermatophytes *Trichophyton* and *Microsporum*. *Microbiology* 2004a; **150**: 301-310.
- Jousson O, Lechenne B, Bontems O, Mignon B, Reichard U, Barblan J, Quadroni M, Monod M. Secreted subtilisin gene family in *Trichophyton rubrum*. *Gene* 2004b; **339**: 79-88.
- Kadotani N, Nakayashiki H, Tosa Y, Mayama S. RNA silencing in the phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. *Mol Plant Microbe Interact* 2003; **16**: 769-776.
- Kahlke B, Brasch J, Christophers E, Schroder JM. Dermatophytes contain a novel lipid-like leukocyte activator. *J Invest Dermatol* 1996; **107**: 108-112.

Kaminishi H, Miyaguchi H, Tamaki T, Suenaga N, Hisamatsu M, Mihashi I, Matsumoto H, Maeda H, Hagihara Y. Degradation of humoral host defense by *Candida albicans* proteinase. *Infect Immun* 1995; **63**: 984-988.

Kaufman G, Horwitz BA, Hadar R, Ullmann Y, Berdicevsky I. Green fluorescent protein (GFP) as a vital marker for pathogenic development of the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes*. *Microbiology* 2004; **150**: 2785-2790.

Kaufman G, Berdicevsky I, Woodfolk JA, Horwitz BA. Markers for host-induced gene expression in *Trichophyton* dermatophytosis. *Infect Immun* 2005; **73**: 6584-6590.

Kaufman G, Horwitz BA, Duek L, Ullman Y, Berdicevsky I. Infection stages of the dermatophyte pathogen *Trichophyton*: microscopic characterization and proteolytic enzymes. *Med Mycol* 2007; **45**: 149-155.

Kerbs S, Greenberg J, Jesrani K. Temporal correlation of lymphocyte blastogenesis, skin test responses and erythema during dermatophyte infections. *Clin Exp Immunol* 1977; **27**: 526-530.

King RD, Khan HA, Foye JC, Greenberg JH, Jones HE. Transferrin, iron, and dermatophytes. I. Serum dermatophyte inhibitory component definitively identified as unsaturated transferrin. *J Lab Clin Med* 1975; **86**: 204-212.

Klemba M, Goldberg DE. Biological roles of proteases in parasitic protozoa. *Annu Rev Biochem* 2002; **71**: 275-305.

Kobayashi H, Debeauvais JP, Bouchara JP, Latge JP. An 88-kilodalton antigen secreted by *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1993; **61**: 4767-4771.

Koçak M, Deveci MS, Ekşioğlu M, Günhan O, Yağlı S. Immunohistochemical analysis of the infiltrated cells in *tinea capitis* patients. *J Dermatol* 2002; **29**: 131-135.

Koga T, Ishizaki H, Matsumoto T, Hori Y. Cytokine production of peripheral blood mononuclear cells in a dermatophytosis patient in response to stimulation with trichophytin. *J Dermatol* 1993; **20**: 441-443.

Koga T, Ishizaki H, Matsumoto T, Hori Y. *In vitro* release of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor by peripheral blood mononuclear cells of dermatophytosis patients in response to stimulation with trichophytin. *Clin Exp Dermatol* 1994; **19**: 94-95.

Koga T, Ishizaki H, Matsumoto T, Hori Y. Decreased release of interferon-gamma by peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic dermatophytosis in response to stimulation with trichophytin. *Acta Derm Venereol* 1995a; **75**: 81-82.

Koga T, Ishizaki H, Matsumoto T, Hori Y. Impaired release of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor by peripheral blood mononuclear cells of patients with chronic dermatophytosis in response to stimulation with trichophytin. *Acta Derm Venereol* 1995b; **75**: 247-248.

Koga T, Shimizu A, Nakayama J. Interferon-gamma production in peripheral lymphocytes of patients with *tinea pedis*: comparison of patients with and without *tinea unguium*. *Med Mycol*

2001a; **39**: 87-90.

Koga T, Duan H, Urabe K, Furue M. Immunohistochemical detection of interferon-gamma-producing cells in dermatophytosis. *Eur J Dermatol* 2001b; **11**: 105-107.

Kortt AA, Stewart DJ. Properties of the extracellular acidic proteases of *Dichelobacter nodosus*. Stability and specificity of peptide bond cleavage. *Biochem Mol Biol Int* 1994; **34**: 1167-1176.

Kothary MH, Chase T, Macmillan JD. Correlation of elastase production by some strains of *Aspergillus fumigatus* with ability to cause pulmonary invasive aspergillosis in mice. *Infect Immun* 1984; **43**: 320-325.

Kotnik T, Kozuh Erzen N, Kuzner J, Drobic-Kosorok M. Terbinafine hydrochloride treatment of *Microsporum canis* experimentally-induced ringworm in cats. *Vet Microbiol* 2001; **83**: 161-168.

Krajaejun T, Gauthier GM, Rappleye CA, Sullivan TD, Klein BS. The development and application of a GFP sentinel system for the identification of RNA interference in *Blastomyces dermatitidis* illuminates the role of septin in morphogenesis and sporulation. *Eukaryot Cell* 2007; publication *on line*.

Kumagai Y, Konishi K, Gomi T, Yagishita H, Yajima A, Yoshikawa M. Enzymatic properties of dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* and its participation in virulence. *Infect Immun* 2000; **68**: 716-724.

Kumagai Y, Yajima A, Konishi K. Peptidase activity of dipeptidyl aminopeptidase IV produced by *Porphyromonas gingivalis* is important but not sufficient for virulence. *Microbiol Immunol* 2003; **47**: 735-743.

Kumagai Y, Yagishita H, Yajima A, Okamoto T, Konishi K. Molecular mechanism for connective tissue destruction by dipeptidyl aminopeptidase IV produced by the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 2005; **73**: 2655-2664.

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

Kunert J. Effect of reducing agents on proteolytic and keratinolytic activity of enzymes of *Microsporum gypseum*. *Mycoses* 1992; **35**: 343-348.

Lambeir AM, Proost P, Durinx C, Bal G, Senten K, Augustyns K, Scharpe S, Van Damme J, De Meester I. Kinetic investigation of chemokine truncation by CD26/dipeptidyl peptidase IV reveals a striking selectivity within the chemokine family. *J Biol Chem* 2001; **276**: 29839-29845.

Lambeir AM, Durinx C, Scharpé S, De Meester I. Dipeptidyl-peptidase IV from bench to bedside: an update on structural properties, functions, and clinical aspects of the enzyme DPP IV. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2003; **40**: 209-294.

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

- Latge JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev* 1999; **12**: 310-350.
- Leach DR. Long DNA palindromes, cruciform structures, genetic instability and secondary structure repair. *Bioessays* 1994; **16**: 893-900.
- Léchenne B, Reichard U, Zaugg C, Fratti M, Kunert J, Boulat O, Monod M. Sulphite efflux pumps in *Aspergillus fumigatus* and dermatophytes. *Microbiology* 2007; **153**: 905-913.
- Lee M, Fridman R, Mobashery S. Extracellular proteases as targets for treatment of cancer metastases. *Chem Soc Rev* 2004; **33**: 401-409.
- Leibovici V, Evron R, Axelrod O, Westerman M, Shalit M, Barak V, Frankenburg S. Imbalance of immune responses in patients with chronic and widespread fungal skin infection. *Clin Exp Dermatol* 1995; **20**: 390-394.
- Lidell ME, Moncada DM, Chadee K, Hansson GC. *Entamoeba histolytica* cysteine proteases cleave the MUC2 mucin in its C-terminal domain and dissolve the protective colonic mucus gel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**: 9298-9303.
- Limjindaporn T, Khalaf RA, Fonzi WA. Nitrogen metabolism and virulence of *Candida albicans* require the GATA-type transcriptional activator encoded by GAT1. *Mol Microbiol* 2003; **50**: 993-1004.
- Liu H, Cottrell TR, Pierini LM, Goldman WE, Doering TL. RNA interference in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Genetics* 2002; **160**: 463-470.
- Lobachev KS, Shor BM, Tran HT, Taylor W, Keen JD, Resnick MA, Gordenin DA. Factors affecting inverted repeat stimulation of recombination and deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1998; **148**: 1507-1524.
- Lobachev KS, Rattray A, Narayanan V. Hairpin- and cruciform-mediated chromosome breakage: causes and consequences in eukaryotic cells. *Front Biosci* 2007; **12**: 4208-4220.
- Lopez-Garcia B, Lee PH, Gallo RL. Expression and potential function of cathelicidin antimicrobial peptides in dermatophytosis and *tinea versicolor*. *J Antimicrob Chemother* 2006; **57**: 877-882.
- Louie A, Dixon DM, el-Maghrabi EA, Burnett JW, Baltch AL, Smith RP. Relationship between *Candida albicans* epidermolytic proteinase activity and virulence in mice. *J Med Vet Mycol* 1994; **32**: 59-64.
- Lubkowitz MA, Hauser L, Breslav M, Naider F, Becker JM. An oligopeptide transport gene from *Candida albicans*. *Microbiology* 1997; **143**: 387-396.
- Lunder M., Lunder M. Is *Microsporium canis* infection about to become a serious dermatological problem? *Dermatology* 1992; **184**: 87-89.
- MacCarthy KG, Blake JS, Johnson KL, Dahl MV, Kalish RS. Human dermatophyte-responsive T-cell lines recognize cross-reactive antigens associated with mannose-rich glycoproteins. *Exp Dermatol* 1994; **3**: 66-71.



- MacDonald T, Brown D, Keller NP, Hammond TM. RNA silencing of mycotoxin production in *Aspergillus* and *Fusarium* species. *Mol Plant Microbe Interact* 2005; **18**: 539-545.
- Mac Enzie DWR, Loeffler W, Mantovani A, Fujikura T. *Guidelines for the diagnosis, prevention and control of dermatophytoses in man and animal*. Geneva: World Health Organization, 1986: 55-68.
- McCluskey K. The Fungal Genetics Stock Center: from molds to molecules. *Adv Appl Microbiol* 2003; **52**: 245-262.
- Mancianti F, Giannelli C, Bendinelli M, Poli A. Mycological findings in feline immunodeficiency virus-infected cats. *J Med Vet Mycol* 1992; **30**: 257-259.
- Mancianti F, Pedonese F, Zullino C. Efficacy of oral administration of itraconazole to cats with dermatophytosis caused by *Microsporum canis*. *J Am Vet Med Assoc* 1998; **213**: 993-995.
- Mancianti F, Pedonese F, Millanta F, Guarnieri L. Efficacy of oral terbinafine in feline dermatophytosis due to *Microsporum canis*. *J Feline Med Surg* 1999; **1**: 37-41.
- Mancianti F, Nardoni S, Cecchi S, Corazza M, Taccini F. Dermatophytes isolated from symptomatic dogs and cats in Tuscany, Italy during a 15-year-period. *Mycopathologia* 2002; **156**: 13-18.
- Mann B, Orihuela C, Antikainen J, Gao G, Sublett J, Korhonen TK, Tuomanen E. Multifunctional role of choline binding protein G in pneumococcal pathogenesis. *Infect Immun* 2006; **74**: 821-829.
- Manoyan, MG, Panin AN, Letyagin KP. Effectiveness of Microderm vaccine against dermatophytosis in animals. *Vet Dermatol* 2000; **12** (Suppl 1):59.
- Maraki S, Tselentis Y. Survey on the epidemiology of *Microsporum canis* infections in Crete, Greece over a 5-year period. *Int J Dermatol* 2000; **39**: 21-24.
- Marion CL, Rappleye CA, Engle JT, Goldman WE. An alpha-(1,4)-amylase is essential for alpha-(1,3)-glucan production and virulence in *Histoplasma capsulatum*. *Mol Microbiol* 2006; **62**: 970-983.
- Marzluf GA. Genetic regulation of nitrogen metabolism in the fungi. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997; **61**: 17-32.
- Mason KV, Frost A, O'Boyle D, Connole MD. Treatment of a *Microsporum canis* infection in a colony of Persian cats with griseofulvin and a shampoo containing 2% miconazole, 2% chlorhexidine, 2% miconazole and 2% chlorexidine or a placebo. *Veterinary Dermatology* 2000; **12** (Suppl 1): 55.
- Matthews RC, Rigg G, Hodgetts S, Carter T, Chapman C, Gregory C, Illidge C, Burnie J. Preclinical assessment of the efficacy of mycograb, a human recombinant antibody against fungal HSP90. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 2208-2216.
- Mayo B, Kok J, Bockelmann W, Haandrikman A, Leenhouts KJ, Venema G. Effect of X-Prolyl Dipeptidyl Aminopeptidase Deficiency on *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol* 1993; **59**: 2049-2055.

- Medleau L, Rakich PM. *Microsporium canis* pseudomycetomas in a cat. *J Am Anim Hosp Assoc* 1994; **30**: 573-576.
- Mentlein R. Dipeptidyl-peptidase IV (CD26)--role in the inactivation of regulatory peptides. *Regul Pept* 1999; **85**: 9-24.
- Mignon B. Response to 'Comments on *Microsporium canis*'. *Med Mycol* 1998; **36**: 248.
- Mignon BR, Losson BJ. Prevalence and characterization of *Microsporium canis* carriage in cats. *J Med Vet Mycol* 1997; **35**: 249-256.
- Mignon B, Swinnen M, Bouchara JP, Hofinger M, Nikkels A, Pierard G, Gerday C, Losson B. Purification and characterization of a 315 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporium canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. *Med Mycol* 1998a; **36**: 395-404.
- Mignon BR, Nikkels AF, Pierard GE, Losson BJ. The *in vitro* and *in vivo* production of a 31.5-kDa keratinolytic subtilase from *Microsporium canis* and the clinical status in naturally infected cats. *Dermatology* 1998b; **196**: 438-441.
- Mignon BR, Coignoul F, Leclipteux T, Focant C, Losson BJ. Histopathological pattern and humoral immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporium canis* in symptomatic and asymptomatic infected cats. *Med Mycol* 1999a; **37**: 1-9.
- Mignon BR, Leclipteux T, Focant C, Nikkels AJ, Pierard GE, Losson BJ. Humoral and cellular immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporium canis* in experimentally infected guinea pigs. *Med Mycol* 1999b; **37**: 123-129.
- Mignon B, Hansen P, Le Bleis K, Moreaux N, Brouta F, Descamps F, Vermout S, Losson B. A retrospective epidemiological survey of canine and feline dermatophytosis in Belgium over the period 1996-2001. *Mycoses* 2002; **45** (Suppl 2): 40.
- Miki D, Itoh R, Shimamoto K. RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. *Plant Physiol* 2005; **138**: 1903-1913.
- Moingeon P, Haensler J, Lindberg A. Towards the rational design of Th1 adjuvants. *Vaccine* 2001; **19**: 4363-4372.
- Moncada D, Keller K, Ankri S, Mirelman D, Chadee K. Antisense inhibition of *Entamoeba histolytica* cysteine proteases inhibits colonic mucus degradation. *Gastroenterology* 2006; **130**: 721-730.
- Monod M, Borg-Von Zepelin ZM. Secreted aspartic proteases as virulence factors of *Candida* species. *Biol Chem* 2002; **383**: 1087-1093.
- Monod M, Paris S, Sanglard D, Jatton-Ogay K, Bille J, Latge JP. Isolation and characterization of a secreted metalloprotease of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* 1993a; **61**: 4099-4104.
- Monod M, Paris S, Sarfati J, Jatton-Ogay K, Ave P, Latge JP. Virulence of alkaline protease-deficient mutants of *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* 1993b; **106**: 39-46.

Monod M, Capoccia S, Lechenne B, Zaugg C, Holdom M, Jousson O. Secreted proteases from pathogenic fungi. *Int J Med Microbiol* 2002a; **292**: 405-419.

Monod M, Jaccoud S, Zaugg C, Lechenne B, Baudraz F, Panizzon R. Survey of dermatophyte infections in the Lausanne area Switzerland. *Dermatology* 2002b; **205**: 201-203.

Monod M, Lechenne B, Jousson O, Grand D, Zaugg C, Stocklin R, Grouzmann E. Aminopeptidases and dipeptidyl-peptidases secreted by the dermatophyte *Trichophyton rubrum*. *Microbiology* 2005; **151**: 145-155.

Moriello KA. Diagnostic techniques for dermatophytosis. *Clin Tech Small Anim Pract* 2001; **16**: 219-224.

Moriello KA. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. *Vet Dermatol* 2004; **15**: 99-107.

Moriello KA, DeBoer DJ. Efficacy of griseofulvin and itraconazole in the treatment of experimentally induced dermatophytosis in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1995; **207**: 439-444.

Moriello KA, DeBoer DJ, Greek J, Kuhl K, Fintelman M. The prevalence of immediate and delayed type hypersensitivity reactions to *Microsporum canis* antigens in cats. *J Feline Med Surg* 2003; **5**: 161-166.

Moriello KA, Deboer DJ, Schenker R, Blum JL, Volk LM. Efficacy of pre-treatment with lufenuron for the prevention of *Microsporum canis* infection in a feline direct topical challenge model. *Vet Dermatol* 2004; **15**: 357-362.

Mouyna I, Henry C, Doering TL, Latgé JP. Gene Silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS Microbiol Lett* 2004; **237**: 317-324.

Muller GH, Kirk RW, Scott DW. Fungal diseases. In: Dyson J (Ed). *Small animal dermatology*, 4<sup>th</sup> edn. WB Saunders, Philadelphia, 1989: 295-346.

Naglik J, Albrecht A, Bader O, Hube B. *Candida albicans* proteinases and host/pathogen interactions. *Cell Microbiol* 2004; **6**: 915-926.

Nakamura Y, Kano R, Hasegawa A, Watanabe S. Interleukin-8 and tumor necrosis factor alpha production in human epidermal keratinocytes induced by *Trichophyton mentagrophytes*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; **9**: 935-937.

Nakayama K. Molecular genetics of *Porphyromonas gingivalis*: gingipains and other virulence factors. *Curr Protein Pept Sci* 2003; **4**: 389-95.

Nakayashiki H. RNA silencing in fungi: mechanisms and applications. *FEBS Lett* 2005; **579**: 5950-5957.

Nakayashiki H. Application of RNA silencing in *Magnaporthe oryzae*. Plant and Animal Genomes XIV Conference, 2006, San Diego, January 14-18.

Nakayashiki H, Hanada S, Bao Quoc N, Kadotani N, Tosa Y, Mayama S. RNA silencing as a

- tool for exploring gene function in ascomycete fungi. *Fungal Genet Biol* 2005; **42**: 275-283.
- Nakayashiki H, Kadotani N, Mayama S. Evolution and diversification of RNA silencing proteins in fungi. *J Mol Evol* 2006; **63**: 127-135.
- Netea MG, Van Der Graaf CA, Vonk AG, Verschuieren I, Van Der Meer JW, Kullberg BJ. The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* 2002; **185**: 1483-1489.
- Netea MG, Warris A, Van der Meer JW, Fenton MJ, Verver-Janssen TJ, Jacobs LE, Andresen T, Verweij PE, Kullberg BJ. *Aspergillus fumigatus* evades immune recognition during germination through loss of toll-like receptor-4-mediated signal transduction. *J Infect Dis* 2003; **188**: 320-326.
- Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH, Hartung T, Adema G, Kullberg BJ. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 2004; **172**: 3712-3718.
- Netea MG, Van der Meer JW, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. In: Brown GD, Netea MG (eds). Immunology of fungal infections. Springer, Heidelberg, 2007: 259-272.
- Nicolas FE, Torres-Martinez S, Ruiz-Vazquez RM. Two classes of small antisense RNAs in fungal RNA silencing triggered by non-integrative transgenes. *EMBO J* 2003; **22**: 3983-3991.
- Ogawa H, Summerbell RC, Clemons KV, Koga T, Ran YP, Rashid A, Sohnle PG, Stevens DA, Tsuboi R. Dermatophytes and host defence in cutaneous mycoses. *Med Mycol* 1998; **36** (Suppl 1): 166-173.
- Ohtsuki T, Tsuda H, Morimoto C. Good or evil: CD26 and HIV infection. *J Dermatol Sci* 2000; **22**: 152-160.
- Ollert MW, Sohnchen R, Korting HC, Ollert U, Brautigam S, Brautigam W. Mechanisms of adherence of *Candida albicans* to cultured human epidermal keratinocytes. *Infect Immun* 1993; **61**: 4560-4568.
- Pacheco R, Martinez-Navio JM, Lejeune M, Climent N, Oliva H, Gatell JM, Gallart T, Mallol J, Lluís C, Franco R. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 9583-9588.
- Panasiti V, Devirgiliis V, Borroni RG, Mancini M, Curzio M, Rossi M, Bottoni U, Calvieri S. Epidemiology of dermatophytic infections in Rome, Italy: a retrospective study from 2002 to 2004. *Med Mycol* 2007; **45**: 57-60.
- Pei Y, Tuschl T. On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nat Methods* 2006; **3**: 670-676.
- Pellier AL, Lauge R, Veneault-Fourrey C, Langin T. CLNR1, the AREA/NIT2-like global nitrogen regulator of the plant fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum* is required for the infection cycle. *Mol Microbiol* 2003; **48**: 639-655.

- Pier AC, Zancanella PJ. Immunization of horses against dermatophytosis caused by *Trichophyton equinum*. *Equine Pract* 1993; **15**: 23-27.
- Pier AC, Hodges AB, Lauze JM, Raisbeck M. Experimental immunity to *Microsporum canis* and cross reactions with other dermatophytes of veterinary importance. *J Med Vet Mycol* 1995; **33**: 93-97.
- Pleguezuelos O, Dainty SJ, Kapas S, Taylor JJ. A human oral keratinocyte cell line responds to human heat shock protein 60 through activation of ERK1/2 MAP kinases and up-regulation of IL-1beta. *Clin Exp Immunol* 2005; **141**: 307-314.
- Quaife RA, Womar SM. *Microsporum canis* isolations from show cats. *Vet Rec* 1982; **110**: 333-334.
- Rappleye CA, Engle JT, Goldman WE. RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. *Mol Microbiol* 2004; **53**: 153-165.
- Rashid A, Scott E, Richardson MD. Early events in the invasion of the human nail plate by *Trichophyton mentagrophytes*. *Br J Dermatol* 1995a; **133**: 932-940.
- Rashid A, Edward M, Richardson MD. Activity of terbinafine on *Trichophyton mentagrophytes* in a human living skin equivalent model. *J Med Vet Mycol* 1995b; **33**: 229-233.
- Raska M., Rybnikar A., Chumela J., Belakova J., Weigl E. Recombinant protein and DNA vaccines derived from hsp60 *Trichophyton mentagrophytes* control the clinical course of trichophytosis in bovine species and guinea-pigs. *Mycoses* 2004; **47**: 407-417.
- Rawlings ND, Morton FR, Barrett AJ. *MEROPS*: the peptidase database. *Nucleic Acids Res* 2006; **34**: D270-D272.
- Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 2001; **276**: 37692-37699.
- Reichard U, Monod M, Odds F, Ruchel R. Virulence of an aspergillopepsin-deficient mutant of *Aspergillus fumigatus* and evidence for another aspartic proteinase linked to the fungal cell wall. *J Med Vet Mycol* 1997; **35**: 189-196.
- Reichard U, Cole GT, Hill TW, Ruchel R, Monod M. Molecular characterization and influence on fungal development of ALP2, a novel serine proteinase from *Aspergillus fumigatus*. *Int J Med Microbiol* 2000; **290**: 549-558.
- Reichard U, Lechenne B, Asif AR, Streit F, Grouzmann E, Jousson O, Monod M. Sedolisins, a new class of secreted proteases from *Aspergillus fumigatus* with endoprotease or tripeptidyl-peptidase activity at acidic pHs. *Appl Environ Microbiol* 2006; **72**: 1739-1748.
- Richardson MD, Bell Y. Non-opsonic phagocytosis of *Trichophyton mentagrophytes* arthroconidia by human neutrophils *in vitro*. *J Med Microbiol* 1995; **42**: 225-229.
- Rigolet P, Xi XG, Rety S, Chich JF. The structural comparison of the bacterial PepX and human DPP-IV reveals sites for the design of inhibitors of PepX activity. *FEBS J* 2005; **272**:

2050-2059.

Robinson A, Sparkes AH, Day MJ. Local cell recruitment and cytokine production following intradermal injection with *Microsporium canis* antigen in cats. 4<sup>th</sup> World Congress of Veterinary Dermatology; San Francisco, 2000: 7-8.

Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol* 2004; **42**: 485-498.

Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2004; **4**: 1-23.

Romano C. *Tinea capitis* in Siena, Italy. An 18-year survey. *Mycoses* 1999; **42**: 559-562.

Rubin H. Systemic effects of cancer: role of multiple proteases and their toxic peptide products. *Med Sci Monit* 2005; **11**: RA221-RA228.

Rudd PM, Elliott T, Cresswell P, Wilson IA, Dwek RA. Glycosylation and the immune system. *Science* 2001; **291**: 2370-2376.

Ruiz-Diez B. Strategies for the transformation of filamentous fungi. *J Appl Microbiol* 2002; **92**: 189-195.

Rybnikar, A., Chumela, J., Vrzal, V. Prophylactic and therapeutic use of a vaccine against trichophytosis in a large herd of silver foxes and arctic foxes. *Acta Vet Brno* 1991; **60**, 285-288.

Rycroft AN, McLay C. Disinfectants in the control of small animal ringworm due to *Microsporium canis*. *Vet Rec* 1991; **129**: 239-241.

Sambrook J, Fritsch FF, Maniatis T. Molecular cloning : a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

Sato K, Yang XL, Yudate T, Chung JS, Wu J, Luby-Phelps K, Kimberly RP, Underhill D, Cruz PD Jr, Ariizumi K. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem* 2006; **281**: 38854-38866.

Savin C, Huck S, Rolland C, Benderdouche M, Faure O, Noacco G, Menotti J, Candolfi E, Pelloux H, Grillot R, Coupe S, Derouin F. Multicenter evaluation of a commercial PCR-enzyme-linked immunosorbent assay diagnostic kit (Onychodiag) for diagnosis of dermatophytic onychomycosis. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 1205-1210.

Saxena S, Jonsson ZO, Dutta A. Small RNAs with imperfect match to endogenous mRNA repress translation. Implications for off-target activity of small inhibitory RNA in mammalian cells. *J Biol Chem* 2003; **278**: 44312-44319.

Scazzocchio C. The fungal GATA factors. *Curr Opin Microbiol* 2000; **3**: 126-131.

Schaller M, Korting HC, Schafer W, Bastert J, Chen W, Hube B. Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. *Mol Microbiol* 1999; **34**: 169-180.

Schaller M, Boeld U, Oberbauer S, Hamm G, Hube B, Korting HC. Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an *in vitro* model of oral candidosis. *Microbiology* 2004; **150**: 2807-2813.

Scott DW, Miller WH, Griffin CE. Fungal skin diseases. In: Muller GH, Kirk RW (Eds). *Small animal dermatology*. Saunders WB, Philadelphia, 2001: 339-361.

Shah PC, Krajden S, Kane J, Summerbell RC. *Tinea corporis* caused by *Microsporum canis*: report of a nosocomial outbreak. *Eur J Epidemiol* 1988; **4**: 33-38.

Shai Y, Makovitzky A, Avrahami D. Host defense peptides and lipopeptides: modes of action and potential candidates for the treatment of bacterial and fungal infections. *Curr Protein Pept Sci* 2006; **7**: 479-486.

Shiraki Y, Ishibashi Y, Hiruma M, Nishikawa A, Ikeda S. Cytokine secretion profiles of human keratinocytes during *Trichophyton tonsurans* and *Arthroderma benhamiae* infections. *J Med Microbiol* 2006; **55**: 1175-1185.

Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT, Levitz SM. Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol* 2001; **166**: 4620-4626.

Sieling PA, Legaspi A, Ochoa MT, Rea TH, Modlin RL. Regulation of human T-cell homing receptor expression in cutaneous bacterial infection. *Immunology* 2007; **120**: 518-525.

Siezen RJ, Leunissen JA. Subtilases: the superfamily of subtilisin-like serine proteases. *Protein Sci* 1997; **6**: 501-523.

Slunt JB, Taketomi EA, Woodfolk JA, Hayden ML, Platts-Mills TA. The immune response to *Trichophyton tonsurans*: distinct T cell cytokine profiles to a single protein among subjects with immediate and delayed hypersensitivity. *J Immunol* 1996; **157**: 5192-5197.

Smith JM, Tang CM, Van Noorden S, Holden DW. Virulence of *Aspergillus fumigatus* double mutants lacking restriction and an alkaline protease in a low-dose model of invasive pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* 1994; **62**: 5247-5254.

Snider R, Landers S, Levy ML. The ringworm riddle: an outbreak of *Microsporum canis* in the nursery. *Pediatr Infect Dis J* 1993; **12**: 145-148.

Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Shaw SE, Wright AI, Stokes CR. Epidemiological and diagnostic features of canine and feline dermatophytosis in the United Kingdom from 1956 to 1991. *Vet Rec* 1993a; **133**: 57-61.

Sparkes AH, Stokes CR, Gruffydd-Jones TJ. Humoral immune responses in cats with dermatophytosis. *Am J Vet Res* 1993b; **54**: 1869-1873.

Sparkes AH, Werret G, Stokes Cr, Gruffydd-Jones TJ. *Microsporum canis*: inapparent carriage by the cats and the viability of arthrospores. *J Small Anim Pract* 1994; **35**: 397-401.

Sparkes AH, Stokes CR, Gruffydd-Jones TJ. Experimental *Microsporum canis* infection in cats: correlation between immunological and clinical observations. *J Med Vet Mycol* 1995; **33**: 177-

Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Stokes CR. Acquired immunity in experimental feline *Microsporium canis* infection. *Res Vet Sci* 1996; **61**: 165-168.

Stahl D, Svejgaard E. Lymphocyte transformation *in vitro* in acute dermatophytosis: a follow-up study. *Acta Derm Venereol* 1982; **62**: 289-293.

Steinhoff M, Brzoska T, Luger TA. Keratinocytes in epidermal immune responses. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2001; **1**: 469-476.

Sudowe S, Arps V, Vogel T, Kolsch E. The role of interleukin-4 in the regulation of sequential isotype switch from immunoglobulin G1 to immunoglobulin E antibody production. *Scand J Immunol* 2000; **51**, 461-471.

Sutmuller RP, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, Joosten LA, Akira S, Netea MG, Adema GJ. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest* 2006; **16**: 485-494.

Swan JW, Dahl MV, Coppo PA, Hammerschmidt DE. Complement activation by *Trichophyton rubrum*. *J Invest Dermatol* 1983; **80**: 156-158.

Szepes E, Magyarlaki M, Battyani Z, Schneider I. Immunohistological characterization of the cellular infiltrate in dermatophytosis. *Mycoses* 1993; **36**: 203-206.

Tabart J, Baldo A, Vermout S, Nusgens B, Lapiere C, Losson B, Mignon B. Reconstructed interfollicular feline epidermis as a model for *Microsporium canis* dermatophytosis. *J Med Microbiol* 2007; **56**: 971-975.

Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T, Ohno N, Tamura H, Shibata K, Akashi S, Miyake K, Sugawara S, Takada H. *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-derived mannan induced production of tumor necrosis factor alpha by human monocytes in a CD14- and Toll-like receptor 4-dependent manner. *Microbiol Immunol* 2002; **46**: 503-512.

Tanguay P, Bozza S, Breuil C. Assessing RNAi frequency and efficiency in *Ophiostoma floccosum* and *O. piceae*. *Fungal Genet Biol* 2006; **43**: 804-812.

Thomas MLE, Scheidt VJ, Walker RL. Inapparent carriage of *Microsporium canis* in cats. *Comp Cont Educ Pract* 1989; **11**: 563-571.

Thompson MA, Ohnuma K, Abe M, Morimoto C, Dang NH. CD26/dipeptidyl peptidase IV as a novel therapeutic target for cancer and immune disorders. *Mini Rev Med Chem* 2007; **7**: 253-273.

Torosantucci A, Bromuro C, Chiani P, De Bernardis F, Berti F, Galli C, Norelli F, Bellucci C, Polonelli L, Costantino P, Rappuoli R, Cassone A. A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens. *J Exp Med* 2005; **202**: 597-606.

Van Cutsem J. Animal models for dermatomycotic infections. In: McGinnis MR, Borgers M (Eds). Current topics in Medical Mycology. Springer-Verlag, New York, 1989, Vol. 3: 1-35.



Van Cutsem J, Rochette F. Mycoses des animaux domestiques. Janssen Research Foundation, 1992.

Van Damme J, Struyf S, Wuyts A, Van Coillie E, Menten P, Schols D, Sozzani S, De Meester I, Proost P. The role of CD26/DPP IV in chemokine processing. *Chem Immunol* 1999; **72**: 42-56.

van der Graaf CA, Netea MG, Verschuieren I, van der Meer JW, Kullberg BJ. Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun* 2005; **73**: 7458-7464.

van Oort E, Lerouge P, de Heer PG, Séveno M, Coquet L, Modderman PW, Faye L, Aalberse RC, van Ree R. Substitution of *Pichia pastoris*-derived recombinant proteins with mannose containing O- and N-linked glycans decreases specificity of diagnostic tests. *Int Arch Allergy Immunol* 2004; **135**: 187-195.

Viani FC, Dos Santos JI, Paula CR, Larson CE, Gambale W. Production of extracellular enzymes by *Microsporium canis* and their role in its virulence. *Med Mycol* 2001; **39**: 463-468.

von Geldern TW, Trevillyan JM. The next big thing in diabetes: clinical progress on DPP-IV inhibitors. *Drug Dev Res* 2006; **67**: 627-642.

Wawrzekiewicz K, Ziolkowska G. Specific immunoprophylaxis in *Microsporium canis* infection in guinea pig. *J Mycol Méd* 1996; **6**: 56-62.

Weitzman I, Summerbell RC. The dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 1995; **8**: 240-259.

Weld RJ, Plummer KM, Carpenter MA, Ridgway HJ. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. *Cell Res* 2006; **16**: 31-44.

Woodfolk JA, Platts-Mills TA. Diversity of the human allergen-specific T cell repertoire associated with distinct skin test reactions: delayed-type hypersensitivity-associated major epitopes induce Th1- and Th2-dominated responses. *J Immunol* 2001; **167**: 5412-5419.

Woodfolk JA, Slunt JB, Deuell B, Hayden ML, Platts-Mills TA. Definition of a *Trichophyton* protein associated with delayed hypersensitivity in humans. Evidence for immediate (IgE and IgG4) and delayed hypersensitivity to a single protein. *J Immunol* 1996; **156**: 1695-1701.

Woodfolk JA, Wheatley LM, Piyasena RV, Benjamin DC, Platts-Mills TA. *Trichophyton* antigens associated with IgE antibodies and delayed type hypersensitivity. Sequence homology to two families of serine proteinases. *J Biol Chem* 1998; **273**: 29489-29496.

Woodfolk JA, Sung SS, Benjamin DC, Lee JK, Platts-Mills TA. Distinct human T cell repertoires mediate immediate and delayed-type hypersensitivity to the *Trichophyton* antigen, Tri r 2. *J Immunol* 2000; **165**: 4379-4387.

Woodfolk JA. Allergy and dermatophytes. *Clin Microbiol Rev* 2005; **18**: 30-43.

Woods JP, Goldman WE. Autonomous replication of foreign DNA in *Histoplasma capsulatum*: role of native telomeric sequences. *J Bacteriol* 1993; **175**: 636-641.

Yagishita H, Kumagai Y, Konishi K, Takahashi Y, Aoba T, Yoshikawa M. Histopathological studies on virulence of dipeptidyl aminopeptidase IV (DPPIV) of *Porphyromonas gingivalis* in a mouse abscess model: use of a DPPIV-deficient mutant. *Infect Immun* 2001; **69**: 7159-7161.

Yamada T, Makimura K, Abe S. Isolation, characterization, and disruption of *dnr1*, the *areA/nit-2*-like nitrogen regulatory gene of the zoophilic dermatophyte, *Microsporum canis*. *Med Mycol* 2006; **44**: 243-252.

Yamada O, Ikeda R, Ohkita Y, Hayashi R, Sakamoto K & Akita O. Gene silencing by RNA interference in the Koji mold *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2007; **71**: 138-144.

Zhang L, Pelech SL, Mayrand D, Grenier D, Heino J, Uitto VJ. Bacterial heat shock protein-60 increases epithelial cell proliferation through the ERK1/2 MAP kinases. *Exp Cell Res* 2001; **266**: 11-20.

Zimmerman K, Feldman B, Robertson J, Herring ES, Manning T. Dermal mass aspirate from a Persian cat. *Vet Clin Pathol* 2003; **32**: 213-217.

Zoraghi R, Seebeck T. The cAMP-specific phosphodiesterase TbpPDE2C is an essential enzyme in bloodstream form *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 4343-4348.

Zurita J, Hay RJ. Adherence of dermatophyte microconidia and arthroconidia to human keratinocytes *in vitro*. *J Invest Dermatol* 1987; **89**: 529-534.

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège

4000 Liège (Belgique)

D/2007/0480/25

ISBN 978-2-930404-40-0



9 782930 404400