

**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

**Soutenu publiquement le 11 Septembre 2015  
Par Mlle. Laura Choteau**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990  
tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Le rôle de la Mannose Binding Lectin dans la régulation de  
l'inflammation intestinale et dans la colonisation digestive  
par *Candida albicans***

---

**Membres du jury :**

**Président :** Professeur DECAUDIN Bertrand, PU-PH,  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lille.  
Pharmacien hospitalier, CHRU, Lille.

**Assesseur(s) :** Docteur MAZARS Edith, PH, CH Valenciennes  
Docteur TERRIER-LENGLET Aurélie, MCU-PH,  
UFR de pharmacie, Amiens. CHU, Amiens.

**Directeur de Thèse :** Professeur SENDID Boualem, PU-PH,  
Faculté de Médecine Henri-Warembourg, Lille.  
Laboratoire Parasitologie-Mycologie, CHRU, Lille.  
Directeur Equipe 2/Inserm U995.

**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
D'INNOVATION PHARMACEUTIQUE ET RECHERCHE**

**Soutenu publiquement le 11 Septembre 2015  
Par Mlle. Laura Choteau**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990  
tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**Le rôle de la Mannose Binding Lectin dans la régulation de  
l'inflammation intestinale et dans la colonisation digestive  
par *Candida albicans***

---

**Membres du jury :**

**Président :** Professeur DECAUDIN Bertrand, PU-PH,  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lille.  
Pharmacien hospitalier, CHRU, Lille.

**Assesseur(s) :** Docteur MAZARS Edith, PH, CH Valenciennes  
Docteur TERRIER-LENGLET Aurélie, MCU-PH,  
UFR de pharmacie, Amiens. CHU, Amiens.

**Directeur de Thèse :** Professeur SENDID Boualem, PU-PH,  
Faculté de Médecine Henri-Warembourg, Lille.  
Laboratoire Parasitologie-Mycologie, CHRU, Lille.  
Directeur Equipe 2/Inserm U995.



## Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>



### Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :	Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Vice- présidents :	Professeur Alain DUROCHER Professeur Régis BORDET Professeur Eric KERCKHOVE Professeur Eric BOULANGER Professeur Frédéric LOBEZ Professeur Damien CUNY Professeur Benoit DEPREZ Professeur Murielle GARCIN Monsieur Pierre RAVAUX Monsieur Larbi AIT-HENNANI Monsieur Antoine HENRY
Directeur Général des Services :	Monsieur Pierre-Marie ROBERT

### Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :	Professeur Luc DUBREUIL
Vice-Doyen, 1 <sup>er</sup> assesseur :	Professeur Damien CUNY
Assesseurs :	Mme Nadine ROGER Professeur Philippe CHAVATTE
Chef des services administratifs :	Monsieur Cyrille PORTA

### Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
M.	DUBREUIL	Luc	Bactériologie
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

### Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1

M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GESQUIERE	Jean-Claude	Chimie Organique
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

### Liste des Maitres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

### Liste des Maitres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique

Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
Mme	HOUSSIN-THUILLIER	Pascale	Hématologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVÁ	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie

M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques
M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)

### Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et déontologie pharmaceutique

### Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et déontologie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	FIEVET	Pierre	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	WATRELOS	Michel	Droit et déontologie pharmaceutique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

### AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DROUET	Maryline	Pharmacie Galénique
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique

## ***Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**

## REMERCIEMENTS

### **Aux membres du jury,**

Merci à Monsieur le Professeur Bertrand Décaudin, à Madame Aurélie Terrier-Lenglet et Madame Edith Mazars d'avoir accepté de juger ce travail et de me faire ainsi partager votre savoir.

### **A mon directeur de thèse, Monsieur le Professeur Boualem Sendid,**

Je vous remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir accueillie dans votre laboratoire. Merci également pour votre disponibilité et nos longues discussions. J'ai beaucoup appris de votre expérience et de vos conseils.

### **A mon tuteur, le Docteur Samir Jawhara,**

Merci d'avoir été présent pour encadrer cette thèse pendant ces trois années. Merci pour tout le savoir et l'expérience que tu m'as transmis.

### **Aux membres de l'équipe 2/U995,**

Merci pour votre disponibilité, votre aide au quotidien et votre bonne humeur.

### **A mes chers collègues et amis de manip et d'afterwork,**

Merci de me supporter depuis trois ans! C'est un plaisir de bosser avec vous.

Je dédie cette thèse à ma famille, mon chéri et ma fille qui me soutiennent au quotidien dans cette grande aventure !



## LISTE DES ABREVIATIONS

**ASCA:** Anti- *Saccharomyces cerevisiae* Antibodies

**CRD :** Carbohydrate Recognition Domain

**DSS :** Dextran Sulfate Sodium

**Ig :** Immunoglobuline

**IL :** Interleukine

**KO :** Knock out

**MASP:** MBL Associated Serine Protease

**MBL:** Mannose Binding Lectin

**MC:** Maladie de Crohn

**PAMP:** Pathogen Associated Molecular Pattern

**PLM:** Phospholipomannane

**PPAR:** Peroxisome Proliferator Associated Receptor

**PPM:** Phosphopeptidomannane

**PRR:** Pattern Recognition Receptor

**TLR:** Toll Like Receptor

## TABLE DES MATIERES

I. INTRODUCTION .....	12
II. LE COMPLEXE MBL-MASP (MBL Associated Serine Protease) .....	14
A. Présentation du complexe .....	14
1. Structure de la MBL.....	14
2. Structure de MASP .....	15
3. Expression du complexe MBL-MASP.....	16
B. Fonctions du complexe.....	16
C. Génétique .....	17
1. Le gène <i>MBL2</i> et les gènes <i>MASP</i> .....	17
2. Les polymorphismes <i>MBL-MASP</i> .....	17
III. CANDIDA ALBICANS ET CANDIDOSES.....	19
A. Physiopathologie des Candidoses.....	20
1. De la colonisation du tube digestif aux candidoses invasives .....	20
2. Les formes cliniques de candidoses.....	22
B. Réponse de l'hôte contre l'infection à <i>C. albicans</i> .....	24
1. Structure de la paroi de <i>C. albicans</i> .....	24
2. Reconnaissance de <i>C. albicans</i> par le système immunitaire inné.....	25
3. La réponse cytokinique associée à la reconnaissance de <i>C. albicans</i> .....	27
4. La réponse immunitaire adaptative.....	28
C. Lien entre <i>C. albicans</i> et la MBL .....	28
IV. LA MALADIE DE CROHN (MC).....	30
A. Physiopathologie de la MC .....	30
1. Physiologie de l'épithélium intestinal dans la MC .....	32

2. Les facteurs de risques de la MC .....	33
3. Les caractéristiques inflammatoires et immunitaires de la MC .....	34
B. Relation entre la MC, <i>C. albicans</i> et la MBL .....	35
V. MATERIEL ET METHODE .....	37
A. Le modèle murin C57BL/6 .....	37
B. La souche de <i>C. albicans</i> .....	37
C. Dosage des protéines MBL-A et MBL-C dans les organes.....	37
D. Détection des protéines MBL-A et MBL-C par Western Blot .....	38
E. Etude de la colonisation par <i>C. albicans</i> après blocage du CRD de la MBL.....	38
F. Détection de la protéine MBL-C et de <i>C. albicans</i> par immunofluorescence .....	39
G. Etude de l'impact d'un déficit en MBL sur l'inflammation intestinale et la colonisation par <i>C. albicans</i> .....	39
H. Evaluation histologique des lésions coliques induites par le DSS .....	40
I. Quantification des ARNm de cytokines pro-inflammatoires, de récepteurs de l'immunité innée et des protéines MBL.....	40
VI. RESULTATS .....	41
A. MBL-A et MBL-C sont exprimées dans le tube digestif des souris C57BL/6 .....	41
B. La colonisation par <i>C. albicans</i> augmente l'expression de MBL-A et de MBL-C dans le tube gastro-intestinal des souris .....	43
C. L'opsonisation de <i>C. albicans</i> par la MBL est essentielle pour inhiber la colonisation des souris .....	44
D. Le déficit en MBL exacerbe l'inflammation intestinale et la colonisation digestive par <i>C. albicans</i> .....	46
E. La MBL régule l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des récepteurs de l'immunité innée au niveau du côlon .....	50
VII. DISCUSSION .....	53
VIII. CONCLUSION .....	57

IX. BIBLIOGRAPHIE ..... 58

## I. INTRODUCTION

Notre équipe étudie le lien entre *Candida albicans*, une levure commensale du tube digestif et la maladie de Crohn (MC), une maladie inflammatoire chronique de l'intestin. Dès le début des années 90, notre laboratoire fut le premier à démontrer l'existence des anticorps ASCA, anticorps antimannosides de levures, au cours de la MC ainsi que la capacité de la phase pathogène de *C. albicans* à générer des anticorps ASCA et deux familles d'anticorps anti-glycanes de levures (ALCA, ACCA) (1-3). Cette même équipe a également montré que les patients atteints de MC et leurs parents sains du premier degré sont plus fréquemment et plus intensément colonisés par *C. albicans* que les sujets sains (4). Dernièrement, une étude expérimentale sur un modèle murin de colite chimio-induite, a montré que la colonisation par des levures est favorisée par l'inflammation intestinale et réciproquement, la colonisation fongique promeut l'inflammation intestinale (5). La colonisation par *C. albicans* pourrait au moins exacerber les symptômes de la MC.

Plus récemment, notre laboratoire a commencé à s'intéresser à une lectine du système immunitaire, la Mannose Binding Lectine (MBL) et à son rôle dans la reconnaissance de *C. albicans*.

Le système immunitaire inné constitue la première ligne de défense contre les infections fongiques. Son efficacité dépend de sa capacité à reconnaître les agents pathogènes. Pour cela, il possède plusieurs récepteurs, les Pattern Recognition Receptors (PRRs) comprenant entre autres les lectines, intervenant dans la reconnaissance précoce des agents infectieux (6).

Les lectines sont des glycoprotéines se liant de manière réversible et spécifique aux polysaccharides grâce à des domaines spécifiques de leur structure. Elles permettent la reconnaissance de nombreux micro-organismes et elles favorisent leur phagocytose. Parmi les lectines, il existe la famille des collectines constituées d'une partie de type collagénique et d'une partie lectinique assurant la reconnaissance des polysaccharides. Cette famille comprend la MBL, les lectines du surfactant pulmonaire SP-A et SP-D, la protéine C1q et la conglutinine.

Ces collectines sont capables de reconnaître différents agents infectieux de type bactérie, levure, virus, agents fongiques.

Notre laboratoire a montré que la MBL est capable de reconnaître les mannanes à la surface de *C. albicans* et que les taux de MBL sont très élevés chez les patients atteints de candidoses invasives (7,8). Les données de la littérature montrent également qu'un déficit quantitatif en MBL est fréquemment retrouvé chez les patients atteints de MC, en comparaison à des sujets sains (9). De plus, les patients MC ayant un phénotype clinique sévère (selon les critères de classification de Montréal) ont plus souvent un déficit sévère en MBL que les patients ayant un phénotype clinique modéré (10). Nous nous sommes donc posé la question de savoir si la colonisation gastro-intestinale par *C. albicans* est modulée par la MBL et si cette modulation avait un impact sur l'inflammation intestinale dans la MC (5).

Pour répondre à ces questions, nous avons exploré dans un modèle murin l'expression de la MBL au niveau du tractus gastro-intestinal et étudié son impact sur la modulation de l'inflammation intestinale et l'élimination de *C. albicans*.

Après une description détaillée des trois acteurs impliqués dans cette interaction : la MBL, la levure commensale *C. albicans* et la MC, nous aborderons ensuite la méthodologie employée, les résultats obtenus et leurs impacts sur la compréhension de la physiopathologie de la MC.

## II. LE COMPLEXE MBL-MASP (MBL Associated Serine Protease)

### A. Présentation du complexe

La MBL est une lectine soluble, produite par le foie et présente dans le sérum. Elle circule sous forme d'oligomère, en complexe avec les protéines MASP 1, 2 et 3 (11).

#### 1. Structure de la MBL

La MBL circulante est un oligomère composé de deux à six chaînes polypeptidiques de 32kDa chacune (12). Chaque chaîne est constituée de quatre parties : une partie N-ter constituée de cystéine, une partie collagénique, une neck région et un carbohydrate recognition domaine (CRD). Les monomères forment des oligomères par liaison au niveau de la partie collagénique (Fig. 1).

Le CRD reconnaît les résidus  $\alpha$ -D-mannopyranoses, les L-fucoses et les N-acétyl-D-glucosamines à la surface des microorganismes par une liaison calcium dépendante. Le CRD possède deux sites de liaison au calcium et l'interaction avec les sucres se fait par des ponts d'hydrogène avec 4 acides aminés et des interactions de Van der Waals, stabilisées par l'ion calcium (13).

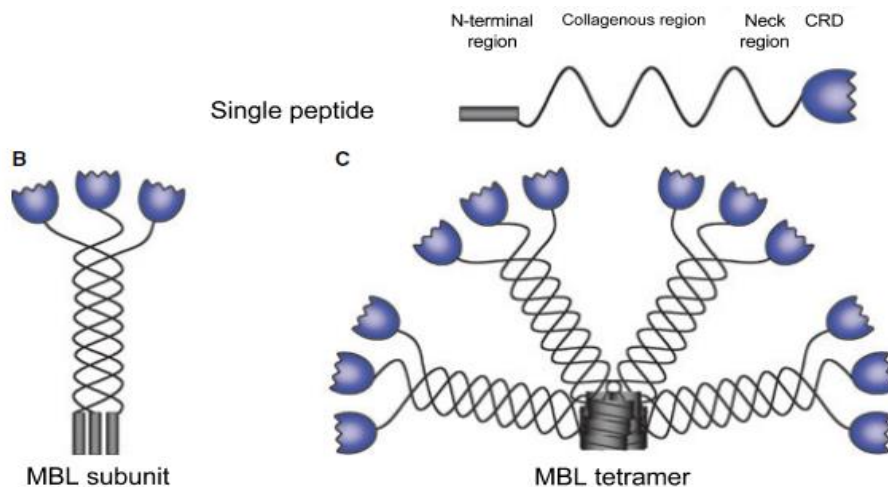
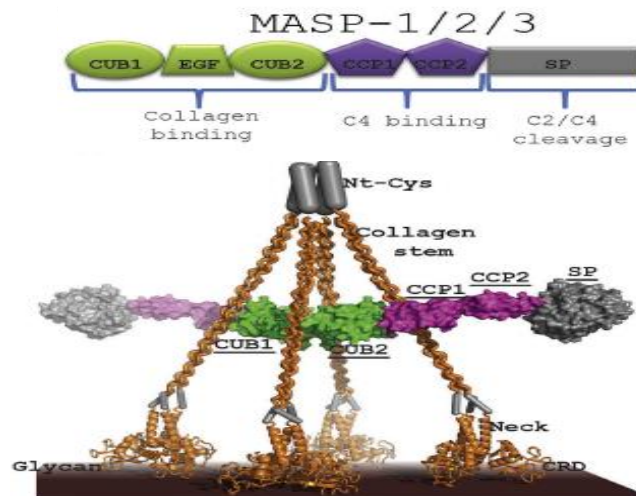


Figure 1 : Structure de la MBL, d'après Ip *et al*, 2009

Chez la souris, il existe deux formes sériques de MBL, la MBL-A et la MBL-C, toutes deux produites par le foie (14). Ces deux protéines ont les mêmes propriétés fonctionnelles et elles possèdent une structure similaire à la MBL humaine.

## 2. Structure de MASP

La MBL circule sous forme de complexe avec les protéines MASP 1, 2 et 3 qui possèdent une activité enzymatique. Il existe également les protéines MAP1, MAP44 et MAP19, codées par les gènes *MASP1*, *MASP3* et *MASP2*, qui se lient à la MBL mais elles ne possèdent pas d'activité enzymatique (15,16). Il existe un haut degré de conservation des protéines MASP entre l'Homme, le rat et la souris. Les protéines MASP sont composées en N-ter de cinq domaines : CUB1, EGF-like, CUB2, CCP1 et CCP2. La partie C-ter est composée d'une sérine protéase, conférant l'activité enzymatique. La partie CCP1-CCP2-SP est capable de fixer les protéines C4 et C2 du complément. Une mutation au niveau de CCP1 inhibe cette liaison (17). Les domaines CUB1-EGF-CUB2 des protéines MASP se lient au domaine collagénique en C-ter de la MBL, au niveau de l'interruption du motif GluXY formant une articulation (18,19). Les protéines MASP1, MASP2 et MASP3 peuvent être fixées sur un même oligomère de MBL (Fig. 2) (20).



**Figure 2** : Structure des protéines MASP1, 2 ou 3 et du complexe MBL-MASP, d'après Kjaer *et al*, 2013.



### 3. Expression du complexe MBL-MASP

Le gène *MBL2* est principalement exprimé dans les cellules hépatiques. Cependant des études ont mis en évidence une faible expression des ARNm de *MBL2*, *MASP1* et *MASP2* dans l'intestin grêle de l'Homme. Le gène *MASP3* est, quant à lui, retrouvé dans le côlon (21). L'expression hépatique du gène *MBL2* peut être induite par les agonistes de *PPARα* et *PPARγ* (22).

Chez la souris, l'ARNm de *MBL-A* a été mis en évidence dans les poumons, les reins et les testicules, tandis que l'ARNm de *MBL-C* a été observé dans les reins, le thymus et l'intestin grêle. La protéine *MBL-C* a été détectée dans les cellules épithéliales intestinales (23). Par contre, le rôle des *PPAR* dans l'induction de l'expression de *MBL-A* et *MBL-C* n'est pas bien défini (22).

## **B. Fonctions du complexe**

Le complexe *MBL-MASP* est capable d'activer la voie lectinique du complément. La reconnaissance des sucres par le CRD de la *MBL* entraîne le clivage des protéines *C2* et *C4* du complément par les protéines *MASP* (11). Plus spécifiquement, *MASP1* est capable de cliver la protéine *C2* du complément et d'activer *MASP2* alors que *MASP2* est capable de s'auto-activer et de cliver les protéines *C2* et *C4* afin de former la *C3* convertase (24). *MASP1* est responsable de 60% de la production de *C2a* nécessaire à la formation de la *C3* convertase (24). Les protéines *MAP1* et *MAP44* sont par contre capables d'inhiber l'activation du complément, notamment par un phénomène de compétition avec *MASP2* pour la protéine *MAP44* (15,16). Chez la souris, en plus de l'activation de la voie lectinique du complément, les protéines *MASP1* et *MASP3* sont impliquées dans l'activation de la voie alternative du complément mais pas chez l'Homme (20).

Le complexe *MBL-MASP* active également la phagocytose des microorganismes par opsonisation, notamment des levures comme *Candida albicans* (25). L'opsonisation peut se faire, soit par l'activation du complément entraînant la libération de *C3b*, soit par opsonisation directe par la *MBL*, reconnue par le *CR1* à la surface des leucocytes (26). *MBL* peut activer l'opsonophagocytose de *C. albicans* par les neutrophiles en favorisant l'expression de *Dectine-1* (25). *MBL* et *TLR-2* coopèrent dans la défense envers *Staphylococcus aureus* (27).

## **C. Génétique**

### **1. Le gène *MBL2* et les gènes *MASP***

Un gène ancestral commun *MBL* a donné par duplication deux gènes *MBL1* et *MBL2*. Le gène *MBL1* ayant régressé au cours de l'évolution, seul le gène *MBL2* code pour la protéine MBL chez l'Homme et il est localisé sur le chromosome 10q11.2-21 (21).

Ce gène est constitué de 4 exons et 3 introns. L'exon1 code pour le peptide signal, il est composé d'un domaine riche en cystéine et de 7 motifs répétés Gly-Xaa-Yaa. L'exon2 est constitué de 12 motifs répétés Gly-Xaa-Yaa, codant pour la région collagénique. L'exon3 code pour la neck région et l'exon4 pour le CRD. Il existe également un exon0 alternatif à l'exon1. Cet exon permet d'initier la transcription du gène *MBL2* et il code pour un transcrit similaire à la protéine MBL (28).

Les protéines MASP liées à la MBL sont codées par trois gènes : *MASP1*, *MASP2* et *MASP3*. Le gène *MASP2*, situé sur le chromosome 1p36.2-3, code pour une protéine MASP2 de 76kDa active et une protéine tronquée MAP19 de 19KDa (29). Le gène *MASP1*, situé sur le chromosome 3, code pour les protéines MASP1, MASP3, MAP1 et MAP44 (30).

Chez la souris, il existe deux gènes *MBL1* et *MBL2*, codant pour deux protéines différentes MBL-A et MBL-C (14). Ils sont positionnés respectivement sur les chromosomes 14 et 19. L'organisation du gène *MASP2* présente de nombreuses similitudes entre l'Homme, le rat et la souris (31). Enfin, les protéines murines MASP1 et MASP3 sont également codées par un gène commun comme chez l'Homme (29).

### **2. Les polymorphismes *MBL-MASP***

Chez l'Homme, il existe une grande hétérozygotie avec plus de 87 polymorphismes dans tout le gène *MBL2* (32). Environ 30% de la population présente un de ces polymorphismes (33). Dans l'exon1, trois polymorphismes altèrent la fonction et les taux de MBL circulante.

La mutation sur le codon 54 entraîne le changement d'une glycine par de l'acide aspartique. La mutation sur le codon 57 correspond à une substitution d'une glycine par

un acide glutamique et la troisième mutation sur le codon 52 entraîne le remplacement d'un résidu arginine par une cystéine. Communément, les allèles comportant les polymorphismes 54, 57 et 52 sont respectivement appelés B, C et D alors que l'allèle normal est appelé A (34). Enfin, il existe également un polymorphisme au niveau de l'exon4 codant pour le CRD.

Les trois polymorphismes sont exprimés différemment selon les populations : l'allèle B est fréquent dans les populations caucasiennes et asiatiques, contrairement à l'allèle C qui est retrouvé dans les populations africaines sub-sahariennes. Enfin l'allèle D, beaucoup moins fréquent que les B et C, est exprimé préférentiellement dans les populations caucasiennes et au nord-est de l'Afrique (34).

Les trois polymorphismes B, C et D, situés dans la partie collagénique de la protéine MBL, entraînent une diminution du degré d'oligomérisation de la protéine. Cela provoque une diminution de sa capacité à se lier au mannane et à activer le complément. De plus, il a été montré que les taux de MBL varient selon le degré d'hétérozygotie. En effet les sujets homozygotes A/A présentent des taux de MBL supérieurs aux sujets A/O ou O/O (35). Il existe également des polymorphismes au niveau du promoteur. Ils sont en position -50 (H/L variant), -221 (X/Y variant) et +4 (P/Q variant). Les haplotypes communs provenant de l'allèle A sont : HYPA, LYPA, LYQA et LXPA. En présence de mutation, les haplotypes retrouvés sont : HYPD, LYPB et LYQC (34).

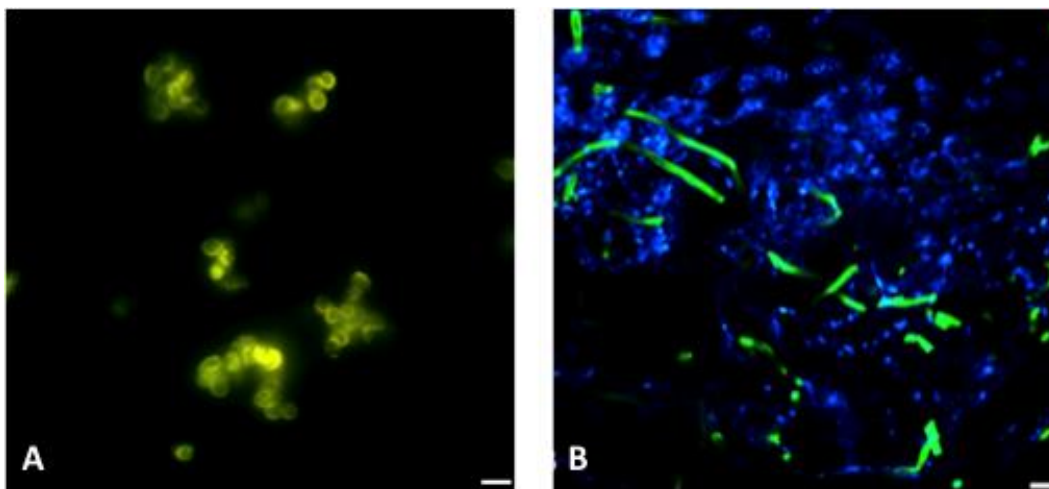
En ce qui concerne les protéines MASP, les taux de MASP2 et les polymorphismes varient d'une population à l'autre. Ainsi, la population chinoise présente un polymorphisme non retrouvé dans les autres populations, qui entraîne des taux faibles en MASP2 (36). Ces polymorphismes peuvent modifier l'activité fonctionnelle des protéines MASP en modifiant les capacités de liaison à la MBL ou en perturbant l'activation du complément (37). Par exemple, une mutation spécifique du résidu K432 situé dans la partie CCP1 de MASP2 empêche la reconnaissance de la protéine C4 et l'activation du complément par MASP2 (17).

Chez la souris, une étude a mis en évidence plusieurs polymorphismes sur les deux gènes *MBL-A* et *MBL-C*. La plupart de ces polymorphismes affectent le CRD des protéines, ayant un impact sur la reconnaissance des microorganismes (38).

Tous ces polymorphismes de MBL et des protéines MASP affectent le fonctionnement du complexe et peuvent être associés à plusieurs pathologies comme les candidoses invasives (39).

### III. CANDIDA ALBICANS ET CANDIDOSES

Le genre *Candida* appartient au phylum des Ascomycota, de l'ordre des Saccharomycetales et de la classe des Hemiascomycetes. Ce sont des champignons microscopiques levuriformes unicellulaires dont le diamètre est compris entre 3 et 10µm et qui se reproduisent par bourgeonnement. *C. albicans* est une levure commensale et opportuniste des muqueuses humaines (principalement le tractus gastro-intestinal et la sphère génitale). *C. albicans* peut ainsi être retrouvé chez l'Homme sous forme de levure (Fig. 3A) sur les muqueuses et sous forme de levure et d'hyphe *in situ*. (Fig. 3B)



**Figure 3** : *C. albicans* observé après marquage fluorescent au microscope confocal sous sa forme levure (A) et sa forme hyphe (B).

## **A. Physiopathologie des Candidoses**

### **1. De la colonisation du tube digestif aux candidoses invasives**

*C. albicans* est l'espèce la plus fréquente au cours des infections à *Candida*. C'est une levure opportuniste, capable de coloniser les muqueuses intestinales et génitales chez 30 à 70% des sujets sains (40).

Au niveau du tube digestif, lors de la phase de colonisation, *C. albicans* est présente uniquement à la surface de l'épithélium intestinal, majoritairement sous forme de blastoconidie. Cette levure n'est alors pas associée à une symptomatologie clinique. La colonisation est favorisée par différents facteurs dont :

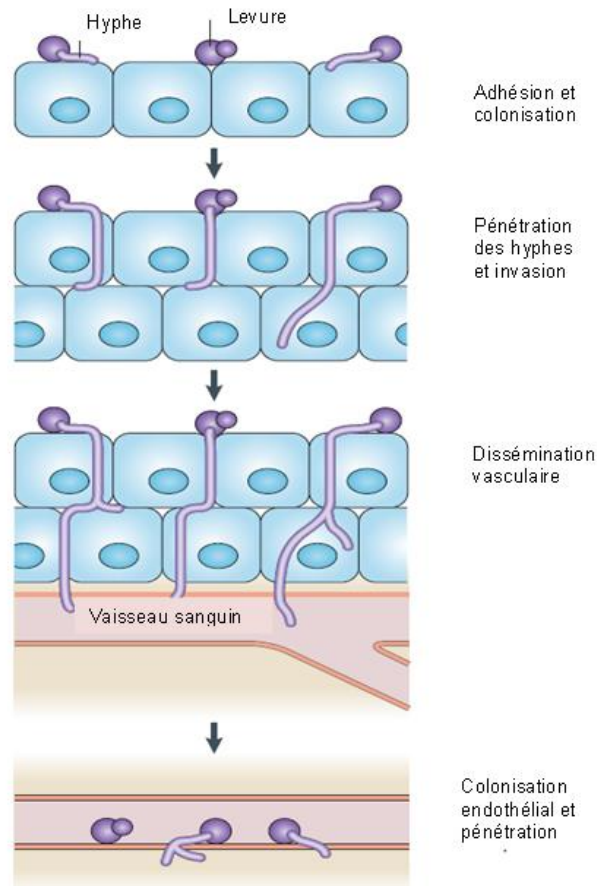
-la sécrétion d'adhésine, comme les protéines de la famille des Als (Agglutinin like sequence), permet l'adhésion aux cellules épithéliales par des liaisons non covalentes alors que d'autres adhésines, comme Hwp1, permettent une adhésion par liaison covalente (41).

-la formation d'un biofilm, permettant l'association de la forme levure et la forme hyphe dans une matrice extracellulaire de nature polysaccharidique (42)

Lors d'une perturbation du système immunitaire ou d'une atteinte de la muqueuse digestive, la levure va disséminer dans le sang et les autres organes, menant à un état pathologique : la candidose invasive.

La transformation de la forme levure à la forme hyphe est importante pour le passage de l'épithélium intestinal et l'invasion tissulaire alors que la forme levure est essentielle pour la dissémination (Fig. 4) (43). Le processus de passage de l'épithélium par la levure est largement débattu dans la littérature et fait intervenir différents mécanismes : i) l'endocytose par les cellules épithéliales, ii) l'endocytose par les cellules M (microfold cells) situées dans l'épithélium intestinal, les cellules dendritiques ou les macrophages, iii) l'effraction de la barrière intestinale et iv) le passage à travers les jonctions serrées de l'épithélium intestinal.

- i) L'endocytose de la forme levure ou hyphe par les cellules épithéliales requiert l'interaction d'adhésines exprimées par *C. albicans* avec des ligands de l'hôte. Ainsi une invasine fongique Asl3, exprimée par la forme hyphe interagit avec les E-cadherin ou N-cadherin de l'hôte, stimulant le recrutement des clathrines (44). Par contre, la pénétration directe des tissus par les hyphes est dépendante du type cellulaire (45).
- ii) L'endocytose par les cellules M, les cellules dendritiques ou les macrophages peut s'expliquer par deux mécanismes. Après reconnaissance au niveau de la muqueuse intestinale, *C. albicans* peut entraîner la lyse de ces cellules soit de manière mécanique grâce à la forme hyphale, soit par activation du phénomène de pyroptose médié par le NLRP3 (46). La lyse des cellules entraîne la libération de *C. albicans*, permettant ainsi le passage de la barrière épithéliale.
- iii) L'effraction de la barrière intestinale est due à la libération d'enzymes hydrolytiques extracellulaires, les Sap (Secreted aspartyl protease), les phospholipases et les lipases (47,48). Ces enzymes favorisent l'adhésion et l'invasion de l'épithélium par les formes levure et hyphe grâce à la digestion des membranes cellulaires et la dégradation des molécules de surfaces de l'hôte, conférant ainsi une résistance au système immunitaire.
- iv) *C. albicans* peut également passer au niveau des jonctions serrées de l'épithélium intestinal. Le mécanisme est peu connu mais une étude a montré que la sécrétion des enzymes de type Sap entraînait la dégradation des E-cadherin au niveau des jonctions serrées, favorisant le passage des hyphes (49).



**Figure 4 :** Pénétration de l'épithélium par *C. albicans* sans endocytose, d'après Gow *et al*, 2012.

## 2. Les formes cliniques de candidoses

Les candidoses peuvent affecter différents tissus. Généralement, les formes cutanées et unguéales seront les formes les plus bénignes. Au niveau muqueux, les formes buccales, digestives et vaginales sont les plus fréquentes. Environ 20% des femmes et 30% des femmes enceintes sont atteintes de candidoses vulvo-vaginales, entraînant des risques de naissance prématurée (50). Les candidoses oropharyngées sont très fréquentes chez les patients atteints du VIH ou immunodéprimés (51).

Les candidoses invasives sont moins fréquentes mais plus graves. En effet, les infections fongiques invasives (IFI) sont l'une des premières causes de mortalité dans les unités de soins intensifs. Les candidoses invasives affectent le plus souvent des patients immunodéprimés ayant un cathéter central ou une nutrition parentérale, les patients transplantés ou sous chimiothérapie (52).

Plus de 90% des IFI sont causées par *Candida* spp. et plus de la moitié sont dues à *C. albicans* (53). La dissémination de la levure par voie hématogène aboutit dans certains cas à un phénomène d'extravasation et de pérennisation dans les organes (54). Les principaux organes pouvant être affectés sont le rein, la rate, le foie et l'œil. La forme hématogène est souvent associée à une mortalité très élevée, notamment dans les unités de soins intensifs où elle atteint une proportion de 40 à 60%. La gravité de ces infections exige donc un suivi régulier des patients et un diagnostic spécifique le plus précocement possible (55). Lorsque le diagnostic est établi, un traitement curatif peut être mis en œuvre en utilisant plusieurs familles de molécules. Le choix de ces molécules est conditionné par la sensibilité de l'agent pathogène, l'état de la fonction rénale du patient et le coût de la molécule. La difficulté du diagnostic biologique a amené certains cliniciens à envisager des stratégies prophylactiques ciblant les populations à risque.

Le diagnostic d'une infection à *Candida* est réputé difficile. Les symptômes cliniques ne sont pas spécifiques et les stratégies mises en œuvre manquent cruellement de sensibilité. A l'heure actuelle, l'hémoculture est la seule méthode de référence ayant une valeur diagnostique indiscutable. L'isolement de *C. albicans* d'un site ouvert (pouvant être contaminé par la flore commensale) ne permet pas de poser le diagnostic. La culture de *C. albicans* peut s'effectuer sur différents milieux sélectifs dont le milieu Sabouraud et les milieux chromogènes (chromoagar candida®, candiselect4®...). Après 24 heures d'incubation à 37°C, *C. albicans* forme des colonies blanches crémeuses correspondant à une accumulation de blastoconidies. En culture dans un sérum, *C. albicans* forme en moins de 3 heures des tubes germinatifs qui donneront du mycélium vrai. Enfin, *C. albicans* peut également se présenter dans un milieu pauvre à 25°C en micro-aérobie, sous forme de pseudofilament ou de cellule de grande taille (10-12µm) appelée chlamydo-spore. L'identification des espèces en pratique clinique fait intervenir des tests d'assimilation des sucres (galerie API 32C) ou plus récemment l'emploi de la spectrométrie de masse de type Maldi-TOF qui permet de réduire considérablement les délais de réponse (56).



Les hémocultures s'avérant négatives dans 50% des cas, des techniques de détection des anticorps, des antigènes circulants et d'amplification d'ADN ont été mises au point pour compléter le diagnostic biologique (57,58).

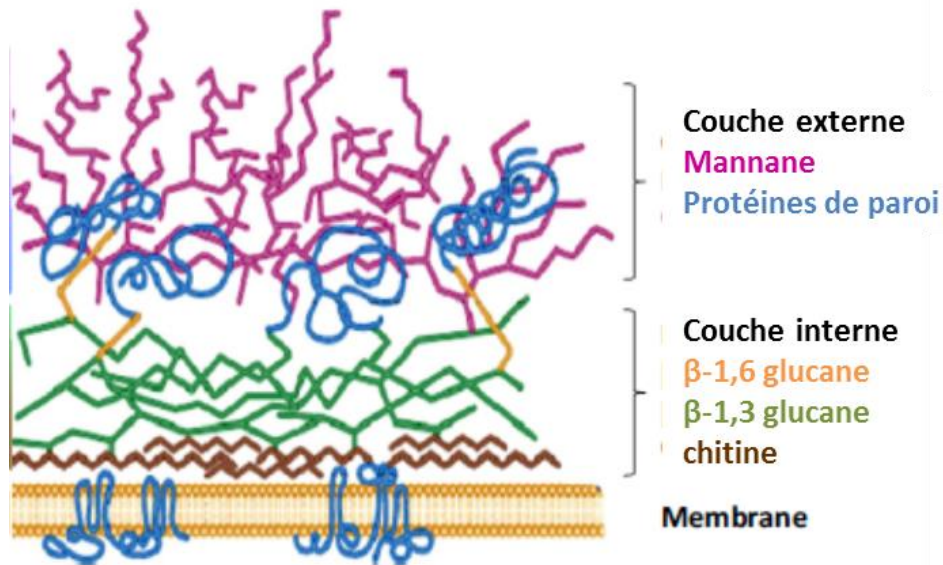
## **B. Réponse de l'hôte contre l'infection à *C. albicans***

Le système immunitaire joue un rôle important dans la reconnaissance de *C. albicans* et dans la réduction de sa dissémination. La majorité des PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) reconnus par le système immunitaire sont des composants de la paroi fongique (59).

### **1. Structure de la paroi de *C. albicans***

La paroi de *C. albicans* est constituée de deux couches. La couche externe contient de nombreuses glycoprotéines et notamment les phosphopeptidomannanes (PPM) ou mannane, composé lui-même de polymères de mannose O- et N- glycosylés comprenant des résidus  $\alpha$ 1,6 ;  $\alpha$ 1,2 ;  $\alpha$ 1,3 et  $\beta$ 1,2 (60). La présence des motifs  $\beta$ -1,2 mannosides différencie *C. albicans* d'une autre levure, *Saccharomyces cerevisiae*. Il existe deux sérotypes de *C. albicans* qui diffèrent par la présence de résidus de  $\beta$ -1,2 oligomannosides sur la partie acide stable du mannane, qui caractérise la présence du sérotype A. Il existe également un glycoconjugué de structure lipidique exprimant les résidus  $\beta$ 1,2 oligomannosides appelé le phospholipomannane (PLM) (61).

La couche interne est composée d'un squelette polysaccharidique comprenant de la chitine, des  $\beta$ -1,3 glucanes et des  $\beta$ -1,6 glucanes. La chitine est un polymère linéaire de résidus N-acétyl-D-glucosamine lié en  $\beta$ -1,4. Les  $\beta$ -glucanes et la chitine sont les composants majeurs de la paroi qui confèrent une résistance chimique et mécanique à la paroi. Les mannoprotéines de la couche externe sont reliées aux glucanes par soit des protéines à ancre GPI (Glycosyl phosphate inositol) qui lient le glucane en  $\beta$ -1,6 ; soit par les protéines PIR (protein with internal repeat) liées en  $\beta$ -1,3 (Fig. 5) (62). La composition des protéines et notamment la longueur de chaîne des glycanes est différente selon le sérotype de *C. albicans* (63).



**Figure 5:** Structure de la paroi de *C. albicans*, d'après Brown *et al*, 2014.

Plusieurs facteurs peuvent modifier la composition de la paroi, notamment la température de culture (63). De nombreux facteurs environnementaux comme le pH, la température, le taux de CO<sub>2</sub> ou encore les UV stimulent la transition blastoconidie/hyphe de *C. albicans* (43). Lors de la formation du tube germinatif, certains gènes codant pour des protéines spécifiques de l'hyphe comme hwp1 (hyphal wall protein 1), hyr1 (hyphally regulated protein 1) ou Als3 (agglutinin like sequence 3) sont surexprimés (43). L'expression de la chitine augmente durant la germination de *C. albicans* et la formation des hyphes (64).

Cette augmentation de chitine peut moduler la réponse immunitaire envers *C. albicans*. En effet, la chitine purifiée est capable de bloquer dans la reconnaissance de *C. albicans* par les monocytes et d'induire une réponse anti-inflammatoire (65).

Ces modifications de la paroi sont très importantes puisqu'elles conditionnent le type de réponse immunitaire et la nature des cellules mises en jeu (Th1, Th2, Th17) (66).

## 2. Reconnaissance de *C. albicans* par le système immunitaire inné

Lors de la colonisation, les neutrophiles et les macrophages ont un rôle essentiel dans la reconnaissance de *C. albicans* et sa phagocytose. Ils mettent en jeu de nombreux récepteurs.

Les Toll-like récepteurs (TLR) sont impliqués dans la reconnaissance du mannane pariétal. En effet, une colonisation intra-gastrique par *C. albicans* entraîne le développement d'une réponse lymphocytaire de type Th1 chez les souris DBA/2. Cette réponse Th1 induite par *C. albicans* est médiée par le récepteur TLR-2 qui stimule la production de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  et d'IL1- $\beta$  (67). Le récepteur TLR-4 permet le recrutement des neutrophiles, en induisant la production des chemokines KC et MIP-2 (68). Le TLR-1 ne paraît pas impliqué dans la reconnaissance de *C. albicans* alors que TLR-6 module les réponses Th1 et Th2. Cependant un déficit en TLR-6 n'influence pas la susceptibilité à *C. albicans* (69).

Une activation des récepteurs PPAR $\gamma$  (peroxysome proliferator-activated receptor) par l'IL-13 ou des PPAR $\gamma$  ligands réduit la colonisation du tube gastro-intestinal des souris par *C. albicans* (70). Le récepteur Dectine-1 est essentiel aux ligands PPAR $\gamma$  pour contrôler l'infection fongique gastro-intestinale. Ce récepteur est capable de reconnaître les  $\beta$  1,3 glucanes dans la paroi de *C. albicans* (71). De plus, Dectine-1 est indispensable aux macrophages pour phagocyter et libérer des ROS à définir (72). Dectine-2 interagit avec le récepteur Fc $\gamma$ R pour reconnaître les résidus  $\alpha$  du mannane (73). Le blocage de Dectine-2 empêche la production d'IL-17 par les cellules T lors d'une infection à *C. albicans* chez la souris (74).

Les récepteurs DC-SIGN et Macrophages mannose receptor (MMR) sont également capables de reconnaître les mannanes à la surface de *C. albicans*. La reconnaissance par DC-SIGN entraîne la production d'IL-6 par les cellules dendritiques (75).

Le récepteur Galectine-3 reconnaît les  $\beta$ -1,2 mannosides et interagit avec TLR-2 pour reconnaître et induire la phagocytose de *C. albicans* (76). Un déficit en galectin-3 chez la souris inhibe la réponse de TLR-2 et la production de TNF- $\alpha$  lors d'une colonisation par *C. albicans* (5).

Le récepteur lectinique Mincle, exprimé par les macrophages, est également impliqué dans la reconnaissance des résidus  $\alpha$  mannosylés du mannane de *C. albicans* (77).

Les deux formes de *C. albicans* (levure et hyphes) ne sont pas reconnues par les mêmes récepteurs. En effet, une étude sur des macrophages a montré qu'une stimulation avec des levures de *C. albicans* favorisait l'expression des récepteurs TLR-4 et Dectine-1 alors que la forme hyphale favoriserait l'expression des récepteurs TLR-2 et Dectine-2 (78).

Enfin, chez la souris, la forme hyphale de *C. albicans* est capable d'induire la lyse des neutrophiles murins après phagocytose alors que la levure est complètement bloquée par les neutrophiles humains (79).

### 3. La réponse cytokinique associée à la reconnaissance de *C. albicans*

La reconnaissance de *C. albicans* par les cellules immunitaires entraîne une réponse cytokinique. Les cellules dendritiques amplifient ce phénomène cytokinique qui permet le recrutement des leucocytes et active la réponse Th1, Th2 ou Th17 (43). Les cytokines IL-1 $\alpha$  et IL-1 $\beta$  sont indispensables à l'induction de la réponse inflammatoire Th1 et à la défense de l'hôte contre les candidoses disséminées (80). Le rôle de NLRP3 est également important. En effet, les hyphes sont capables d'activer l'inflammasome par NLRP3 entraînant une réponse IL-1 $\beta$ . Les souches de *C. albicans* mutées pour leur capacité à filamenter n'induisent pas de réponse IL-1 $\beta$  par les macrophages (81). De plus, les souris déficientes en NLRP3 montrent une sensibilité accrue à l'infection par *C. albicans*. Ces résultats suggèrent le rôle essentiel de NLRP3 dans la réponse immunitaire innée envers *C. albicans* (81). L'association d'IL-22 et de TNF- $\alpha$  permet aussi le maintien de la barrière épithéliale lors d'une infection à *C. albicans* (82).

*C. albicans* possède plusieurs moyens d'évasion au système immunitaire, notamment la transition blastoconidie-hyphes. En effet, la forme hyphale n'induit pas la production d'IL-12 par les cellules dendritiques mais elle favorise la sécrétion d'IL-4, plus inflammatoire (83). De plus, l'hyphes n'induit pas la réponse IFN $\gamma$ , sûrement dû au fait qu'elle n'est pas reconnue par le TLR-4 (84).

Pour empêcher sa reconnaissance par le système immunitaire, *C. albicans* peut également libérer un métabolite du tryptophane (5-hydroxytryptophane) capable d'inhiber la production d'IL-17 par les PBMC (Peripheral blood mononuclear cell) (85).

Enfin, la différence de structure du phospholipomannane (PLM) de la paroi influence la réponse cytokinique. Les PLM des deux sérotypes de *C. albicans* sont capables d'activer la caspase-1 dans un modèle de macrophages murins. Par contre seul le PLM du sérotype A induit une réponse TNF- $\alpha$ , potentialisée par la galectine-3 soluble (86).

#### 4. La réponse immunitaire adaptative

La mise en place de la réponse immunitaire adaptative entraîne la production d'anticorps spécifiques tels que les anticorps ASCA (Anti *Saccharomyces cerevisiae* Antibodies) qui reconnaissent les mannotrioses Man( $\alpha$ 1,3)Man( $\alpha$ 1,2)Man ; les anticorps ACCA (Anti-Chitobioside Carbohydrate Antibodies) pour le chitobioside GlcNAc( $\beta$ 1,4)GlcNAc et les anticorps ALCA (Anti-Laminaribioside Carbohydrate Antibodies) pour le laminaribioside Glc( $\beta$ 1,3)Glc( $\beta$ ) (87). Ces anticorps sont également retrouvés chez les patients atteints de MC, l'une des formes les plus fréquentes des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (1).

### **C. Lien entre *C. albicans* et la MBL**

La MBL agit dans les phases précoces de défense contre les infections à *C. albicans* et elle empêche sa croissance (88). La MBL reconnaît les deux formes de *C. albicans* mais uniquement à 37°C (89). Grâce à des études de SPR (surface Plasmon Resonance), notre laboratoire a montré que cette reconnaissance se fait par le mannane de la paroi (7). La MBL est également capable de reconnaître les résidus mannosidiques exprimés à la surface de la levure et d'activer sa phagocytose directement par les neutrophiles sans activer le complément (25).

Précédemment, nous avons détaillé différents polymorphismes génétiques qui peuvent entraîner une perte d'activité fonctionnelle ou un déficit en MBL. Les taux en MBL sont considérés faibles lorsqu'ils sont inférieurs à 1000 ng/mL et on admet un déficit lorsqu'ils sont inférieurs à 500 ng/mL (33).

Les patients atteints de candidoses invasives présentent des taux significativement plus élevés de MBL circulante que les sujets sains. Ces taux sont inversement corrélés aux taux de mannane circulant (8). A l'inverse, au niveau des candidoses vaginales, les formes récurrentes sont associées au polymorphisme du

gène *MBL2* sur le codon 54 et à une diminution des taux de MBL au niveau vaginal (90). De plus, un déficit en MBL favorise les infections abdominales à levure chez les patients atteints d'une péritonite (39).

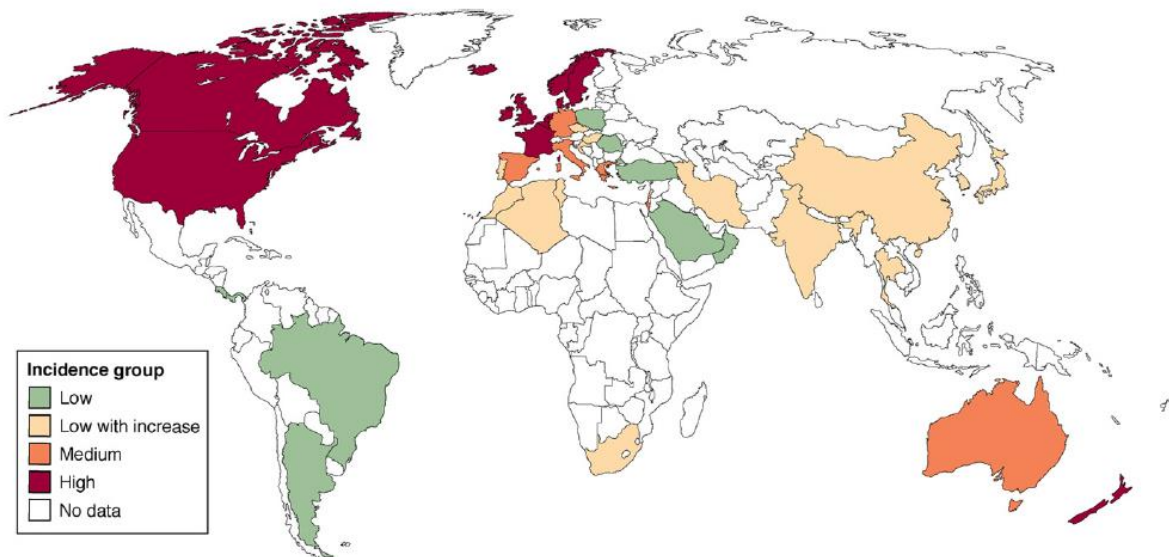
Chez la souris, il a été montré qu'un déficit en MBL-A et MBL-C favorise également la dissémination de *C. albicans* dans un modèle d'infection systémique (91,92). Par contre, un déficit en MBL-A altère nullement la résistance des souris envers les candidoses disséminées (93).

Ces données de la littérature suggèrent l'impact important de la MBL sur la survenue des candidoses invasives. Cependant aucune étude n'a été menée pour déterminer le rôle de la MBL dans la colonisation des muqueuses digestives par *C. albicans*. Cela nous semble important de répondre à cette question puisque le tube digestif constitue la principale porte d'entrée de *C. albicans* avant sa dissémination hématogène (43).

Le déficit en MBL pourrait être également impliqué dans des processus inflammatoires (9). Il a été rapporté que les patients atteints de MC sont plus fréquemment colonisés par *C. albicans* que les sujets sains (4). Il est donc possible qu'un lien existe entre le déficit en MBL, l'augmentation de la colonisation digestive à *C. albicans* et le maintien d'une inflammation incontrôlée telle que décrite au cours de la MC.

#### IV. LA MALADIE DE CROHN (MC)

La MC et la rectocolite hémorragique sont deux formes de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI). Les données épidémiologiques mettent en évidence un gradient nord-sud avec une prévalence et une incidence nettement supérieures dans les pays industrialisés du Nord de l'Europe et des Etats-Unis (Fig. 6).

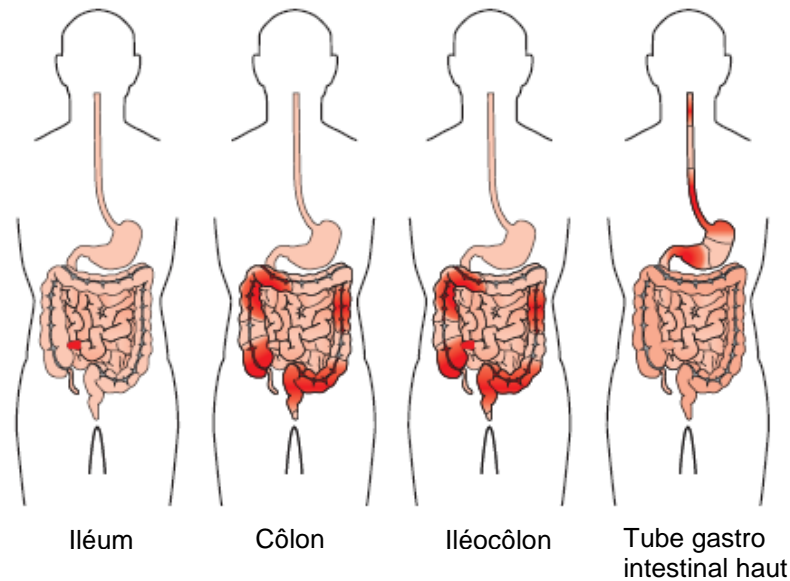


**Figure 6:** Incidence des MICI, d'après Cosnes *et al*, 2011 : incidence supérieure à  $10/10^5$  (rouge), incidence comprise entre 5 et  $10/10^5$  (orange), incidence inférieure à  $4/10^5$  (vert), faible incidence en augmentation (jaune).

##### A. Physiopathologie de la MC

Le tractus gastro-intestinal se divise en trois parties : l'estomac, l'intestin grêle et le gros intestin. L'intestin grêle comprend le duodénum, le jéjunum et l'iléon. Le gros intestin est composé du caecum, du côlon et du rectum. La MC est une MICI pouvant toucher la totalité du tube digestif, contrairement à la rectocolite hémorragique qui touche exclusivement le côlon (Fig. 7).

Son étiologie demeure inconnue, néanmoins, l'hypothèse la plus communément admise est qu'elle serait liée à une dérégulation de la réaction immunitaire muqueuse vis-à-vis d'un microbiote intestinal déséquilibré (dysbiose) sous l'influence de facteurs environnementaux et génétiques.



**Figure 7** : Localisation des lésions inflammatoires rencontrées au cours de la MC, d'après Baumgart *et al*, 2012.

Cette maladie est fréquemment associée à des douleurs abdominales, de la fièvre ainsi que des signes d'obstructions intestinales ou des diarrhées. L'âge au diagnostic, la localisation de l'inflammation et la forme de la maladie permettent de classer les patients et de déterminer la sévérité de la maladie (Fig. 8). Une étude parue en 2010 a montré que les formes iléales et coliques étaient plus fréquentes que les formes iléo-coliques (94).



Classification de Montréal					
Age au diagnostic		Localisation de l'inflammation		Forme de la maladie	
Avant 16 ans	A1	Iléale	L1	Inflammatoire	B1
17-40 ans	A2	Colique	L2	Sténosante	B2
Après 40 ans	A3	Iléocolique	L3	Fistulisante	B3
		Limitée au tube digestif haut	L4		

**Figure 8:** Classement de la MC en fonction de la classification de Montréal

Au niveau physiologique, cette maladie est caractérisée par un trouble fonctionnel de la barrière intestinale.

### 1. Physiologie de l'épithélium intestinal dans la MC

La barrière intestinale permet de séparer la lumière intestinale du reste de l'organisme. Elle est constituée d'un épithélium intestinal, recouvert d'une couche de mucus. L'épithélium intestinal est constitué d'une mono-couche de différents types de cellules. La différence entre l'intestin grêle et le gros intestin se situe dans la surface d'absorption, plus grande dans l'intestin grêle grâce aux nombreuses microvillosités. Les principales cellules sont des entérocytes composés d'un plateau strié permettant l'absorption des nutriments. Trois types de cellules sécrétrices se situent également dans l'épithélium : les cellules de Goblet qui sécrètent les composants du mucus comme MUC2, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth qui sécrètent des granules aux propriétés antimicrobiennes. Les cellules épithéliales sont connectées entre elles par interaction des parties extracellulaires de protéines transmembranaires, formant ainsi les jonctions serrées. Parmi les protéines impliquées, on retrouve les occludines et les claudines (95).

Le mucus qui recouvre l'épithélium assure son hydratation et sa défense contre l'adhésion et l'invasion des pathogènes et des micro-organismes présents dans la flore commensale du tube digestif. Ce mucus est constitué de glycoprotéines, de lipides et d'eau. MUC2 est la glycoprotéine majoritairement retrouvée et elle est sécrétée par les cellules de Goblet.

Au niveau du gros intestin, le mucus est séparé en deux couches : la couche interne épaisse, stérile et accrochée à l'épithélium ; la couche externe plus libre contenant les micro-organismes commensaux.

Chez les patients atteints de MC, cette barrière intestinale peut être perturbée de plusieurs manières : un défaut de production des peptides antimicrobiens par les cellules de l'épithélium, un mucus défectueux, une altération du phénomène d'autophagie ou encore une perméabilité accrue de l'épithélium intestinal (95).

L'augmentation de la perméabilité intestinale s'explique par des jonctions serrées défectueuses en raison d'un changement protéique touchant les claudines (96). Cette modification entraîne un passage des antigènes présents dans la lumière intestinale au niveau de la lamina propria riche en cellules immunitaires. Cette augmentation de la perméabilité intestinale peut également s'expliquer par une augmentation de l'apoptose, entraînant la formation de micro-érosions à la surface de l'épithélium (97).

Le mucus présent à la surface de cette barrière intestinale est également modifié en raison d'une diminution de l'expression de MUC1, MUC3, MUC4 et MUC5B dans les muqueuses saines et enflammées de l'intestin grêle (98).

En ce qui concerne la sécrétion des peptides anti-microbiens, une mutation du gène ATG16L, mutation fréquente chez les patients atteints de MC, entraîne des troubles dans la voie d'exocytose des granules de ces cellules (99).

## 2. Les facteurs de risques de la MC

La MC est une maladie multifactorielle avec des facteurs génétiques et environnementaux. La génétique est un facteur de risque prépondérant dans l'apparition de la MC. En effet, environ 35% des jumeaux monozygotes sont concordants pour la MC et seulement 3% des jumeaux dizygotes (100). L'agrégation de cas familiaux a été également rapportée (101).

Une méta-analyse du génome a mis en évidence 71 loci situés sur 17 chromosomes différents, susceptibles d'être impliqués dans la MC (102). Parmi les gènes impliqués, on retrouve des gènes de l'inflammation (IL-10, CARD9, NOD2) et de

l'immunité innée (TLR-4). La race et l'ethnie influencent aussi le type de MICI et les marqueurs sérologiques (103).

Cependant plusieurs études ont mis en évidence l'importance des facteurs environnementaux sur le développement de la MC et sa sévérité. Plusieurs études ont été menées sur différents facteurs comme l'industrialisation, le régime alimentaire, l'hygiène, la qualité de l'eau du robinet, le mode de vie, la qualité de l'air, etc. Par exemple, une forte concentration en dioxyde d'azote dans l'air favoriserait l'apparition précoce de la maladie (104).

### 3. Les caractéristiques inflammatoires et immunitaires de la MC

Lors de la perte de fonction des jonctions serrées, les antigènes de la lumière intestinale pénètrent dans la lamina propria. Ces antigènes sont reconnus par les cellules du système immunitaire avec une orientation de la réponse vers un profil inflammatoire. La réponse lymphocytaire Th1 est caractéristique de la MC. Elle est expliquée par une augmentation de la sécrétion d'IL-12 et d'IL-18 par les cellules immunitaires mononuclées présentes dans la lamina propria des patients (105). De plus, les cellules CD4<sup>+</sup> présentes dans la lamina propria produisent plus d'IL-17 et d'IFN $\gamma$  que celles du sang périphérique. Cette expression est associée à une augmentation d'IL-23R. Ce qui laisse supposer le rôle de l'IL-23 dans la régulation de la balance Th1/Th17 chez les patients atteints de MC (106). Une surexpression des récepteurs TLR est également présente sur les cellules dendritiques de la muqueuse prélevée de lésions inflammatoires de patients MC (107). Ces cellules expriment de manière plus importante le CD40 et secrètent plus d'IL-12 et d'IL-6 favorisant la réponse inflammatoire.

Chez les patients atteints de MC, on peut retrouver également une altération des récepteurs PRRs impliqués dans la reconnaissance des micro-organismes.

Les récepteurs NOD2 (nucleotide oligomerization domain 2) ou CARD15 sont des PRRs qui reconnaissent une structure spécifique à la surface de certaines bactéries, le muramyl dipeptide. Les méta-analyses génétiques ont mis en évidence le lien entre le gène NOD2 et la MC (102,108). Plus de 15% des patients MC seraient mutés sur les deux allèles du gène NOD2 (109). Cette mutation entraîne une diminution

de la sécrétion d'IL-8 et un défaut de recrutement des neutrophiles. Il y a également un défaut d'induction du phénomène d'autophagie par les cellules dendritiques lorsque NOD2 est muté, empêchant ainsi l'élimination des pathogènes intracellulaires par la cellule infectée (110). Enfin cette mutation inhibe la transcription de l'IL-10 qui contribue à diminuer la réaction inflammatoire (111). Les souris déficientes en NOD2 présentent une perméabilité intestinale élevée et une translocation des bactéries au niveau des plaques de Peyer (112). Cette augmentation de la perméabilité intestinale est favorisée par une augmentation de l'expression des récepteurs TLR-2 et TLR-4. En effet, une étude menée sur des souris CARD15-KO a mis en évidence une augmentation de l'activation de la voie NFκB médiée par le récepteur TLR-2, entraînant ainsi une activation de la réponse Th1 (113).

D'autres récepteurs PRRs peuvent également être impliqués dans le développement de la maladie comme le NLRP3, un composant de l'inflammasome qui active la caspase 1 et permet la maturation de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-18 (95).

## **B. Relation entre la MC, *C. albicans* et la MBL**

Lorsque l'on étudie la littérature, on s'aperçoit que les études font le lien entre la MBL et la MC d'une part, le lien entre *C. albicans* et la MC d'autre part mais très peu s'intéressent au lien entre ces trois composants.

Ces données établissent un lien chez l'Homme et l'animal entre la MBL et la MC. En effet, un déficit quantitatif en MBL, dû à une mutation sur le codon 52 est fréquemment retrouvé chez les patients atteints de MC, en comparaison à des sujets contrôles (9). De plus, les patients ayant un phénotype clinique sévère (selon les critères de classification de Montréal) ont plus souvent un déficit sévère en MBL que les patients ayant un phénotype clinique modéré (10). Dans un modèle murin, les déficits en C1q et en MBL rendent les animaux plus sensibles à la colite chimio-induite (114).

Un lien indirect a été établi entre la MC et *C. albicans* par la mise en évidence d'une réponse humorale élevée envers les glycanes pariétaux de levures (ASCA, ALCA, ACCA), marqueurs diagnostiques de la MC (3). Notre laboratoire a montré que *C. albicans* est un immunogène des anticorps ASCA (1). Cependant cette réponse est stable et importante dans le temps, indépendamment de la colonisation par *C. albicans*

(87). Par contre, une étude rétrospective sur une cohorte de patients atteints de MC a montré qu'ils étaient plus fréquemment et plus intensément colonisés par *C. albicans* que les sujets sains (4). De plus, un modèle murin de MC met en évidence la modulation de la réponse inflammatoire par *C. albicans* lors de la colonisation (5).

L'une des rares études effectuée sur la MC, la MBL et *C. albicans* a montré que chez les patients MC, les taux d'ASCA sont inversement corrélés aux taux sériques de MBL (115).

En fonction de toutes ces données, deux hypothèses peuvent être émises. Soit le déficit en MBL promeut la colonisation par *C. albicans* entraînant une aggravation de l'inflammation intestinale au cours de la MC. Soit le déficit en MBL aggrave l'inflammation intestinale au cours de la MC, favorisant la colonisation par *C. albicans*.

Afin d'explorer ces hypothèses, nous avons décidé d'étudier sur un modèle murin, l'expression de la MBL dans l'épithélium du tube digestif et de déterminer son impact sur l'inflammation intestinale et la colonisation par *C. albicans*.

## **V. MATERIEL ET METHODE**

### **A. Le modèle murin C57BL/6**

Cette étude a reçu l'autorisation du comité d'éthique de Lille et du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (réf n°00550.02). Pour les différentes expériences, nous avons utilisé deux types de souris : des souris de type C57BL/6 contrôles et des souris C57BL/6 modifiées génétiquement dont les deux gènes de la protéine MBL ont été délétés (MBL-KO). Les souris MBL-KO proviennent du laboratoire du Dr Takahashi à Boston. Les deux lignées sont élevées par les laboratoires Charles River (France). Toutes les souris utilisées pour les expériences sont des femelles âgées d'environ 6 à 8 semaines. Pendant les expériences, les souris sont maintenues dans un cycle d'alternance lumineuse de 12h. Elles sont supplémentées en eau et en nourriture sans aucune restriction.

### **B. La souche de *C. albicans***

La souche de *C. albicans* utilisée pour les expériences est la souche de référence SC5314. Les inocula sont préparés à partir de culture en milieu Sabouraud liquide, après incubation de 24h, à 37°C sous agitation. Après 24h, la culture est centrifugée et le culot repris dans du tampon phosphate (PBS) pour préparer les inocula.

### **C. Dosage des protéines MBL-A et MBL-C dans les organes**

La concentration des protéines MBL-A et MBL-C dans les organes a été déterminée par technique ELISA. Les plaques (Nunc-Immuno Maxisorp, Germany) sont sensibilisées avec du mannane de *Saccharomyces cerevisiae* (100µL par puit à 1mg/mL). Les organes récupérés lors du sacrifice sont broyés dans 1mL de PBS puis dilués au ½ dans un tampon TBS (Tris-Buffered-Saline) contenant du calcium nécessaire à la reconnaissance du mannane par la MBL.

Un volume de 100µL d'homogénat est alors déposé dans les puits 1 heure à 4°C. La détection des protéines MBL-A ou MBL-C est réalisée grâce à des anticorps primaires spécifiques anti MBL-A ou MBL-C (Cedarlane) et un anticorps secondaire anti-IgG de rat couplé à la peroxydase (HRP) (Zymed). La lecture s'effectue à 450nm.

Deux gammes d'étalonnage effectuées avec les protéines recombinantes MBL-A ou MBL-C permettent une détermination quantitative des MBL tissulaires.

#### **D. Détection des protéines MBL-A et MBL-C par Western Blot**

Les échantillons d'organes sont broyés et chauffés 5mn à 100°C dans une solution dénaturante contenant du  $\beta$ -mercaptoéthanol et du SDS. Un gel SDS-PAGE prêt à l'emploi est utilisé pour séparer les protéines, en accord avec le manuel d'instruction du fabricant (4-20%; GE healthcare). Ensuite, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Protan; Whatman). La membrane contenant les protéines est incubée à température ambiante dans une solution de saturation (5% de BSA dans du TBS/Tw 2%). Après trois lavages avec du TBS/Tw 2%, la membrane est incubée toute la nuit à 4°C avec un anticorps de rat anti MBL-A ou MBL-C de souris (Cedarlane). Après lavage, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire anti-IgG de rat couplé à la phosphatase alcaline (Jackson, réf 112036072). La révélation se fait par chimiluminescence avec un kit ECL (Thermoscientific, Super signal west pico).

#### **E. Etude de la colonisation par *C. albicans* après blocage du CRD de la MBL**

A J0, les souris contrôles et les souris MBL-KO sont gavées avec un inoculum de  $10^{17}$  levures de *C. albicans* contenu dans 500 $\mu$ L de PBS afin d'initier la colonisation. Ensuite, les souris reçoivent par gavage tous les jours pendant sept jours 500 $\mu$ g de mannane (Sigma Aldrich®), un ligand du CRD de la MBL. Chaque jour, les selles sont récupérées, broyées dans un 1mL de PBS. Un volume de 100 $\mu$ l de cette suspension est étalé sur des géloses de Sabouraud afin de déterminer le nombre de CFU (colony forming unit) après 24h d'incubation à 37°C. Après sacrifice à J7, l'estomac, le caecum et le côlon sont vidés et broyés dans 1mL de PBS. Cent microlitres d'homogénat sont également déposés sur des géloses Sabouraud pour évaluer la colonisation gastro-intestinale. Les résultats sont obtenus en CFU/mg d'organe ou CFU/mg de selles.

## **F. Détection de la protéine MBL-C et de *C. albicans* par immunofluorescence**

Après sacrifice, les tissus sont incubés dans du paraformaldehyde 4% toute la nuit à 4°C. Ils sont ensuite inclus dans de l'OCT (Optimum Cutting Temperature) (Tissue-tek, Sakura Finetek). Des coupes de 10µm sont réalisées et fixées avec de l'éthanol 70% sur des lames de microscopie (Superfrost plus gold, ThermoScientific). Les lames sont conservées à -20°C.

Avant l'immunomarquage, les lames sont réhydratées dans un tampon TBS contenant 0,05% de tween (TBS/Tw 0.05%) et 1% de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma). Pour détecter la protéine MBL-C, les lames sont incubées toute la nuit à 4°C avec un anticorps de rat anti MBL-C de souris (Cedarlane). Après deux lavages en TBS/Tw 0.05%, les lames sont incubées avec un anticorps secondaire anti-IgG de rat couplé à un fluorophore, l'Alexa 568 (Invitrogen). L'actine des cellules épithéliales est marquée avec de la phalloïdine couplé au fluorophore Alexa 488 (Invitrogen).

Pour détecter *C. albicans*, les lames sont incubées avec un anticorps monoclonal 5B2 qui reconnaît les  $\beta$ -oligomannosides sur la paroi de *C. albicans*. Puis les lames sont incubées 1h à 37°C avec un anticorps secondaire anti-IgM de souris couplé à de l'isothiocyanate de fluorescéine (Zymed Laboratories). Les lames sont observées au microscope confocale (LSM710, Carl Zeiss, Jena, Allemagne).

## **G. Etude de l'impact d'un déficit en MBL sur l'inflammation intestinale et la colonisation par *C. albicans***

Pour cette expérience, les souris contrôles et les souris MBL-KO sont utilisées. A J0, les souris reçoivent par gavage un inoculum de  $10^{7.7}$  levures de *C. albicans* dilué dans 500µL de PBS. Nous ajoutons dans l'eau de boisson 1,5% de Dextran Sulfate Sodium (DSS) afin de provoquer une colite chimio-induite chez ces souris. Cette colite mime la MC humaine. Les souris sont observées quotidiennement pendant 14 jours. Tous les jours, nous définissons un score clinique par souris qui dépend de différents critères : l'état général de la souris (signe de prostration ou douleur physique évidente), la consistance des selles et la présence de sang dans les selles.



Le score clinique est compris entre 0 (aucun signe d'inflammation ou de douleur) et 8 (signes importants d'inflammation et de douleur).

Chaque jour, les selles sont récupérées, broyées dans 1mL de PBS et analysées comme précédemment décrit (cf. chapitre E). Les souris sont sacrifiées après 14 jours par dislocation cervicale sous anesthésie à l'isoflurane 5%. Nous récupérons l'estomac, le caecum, le côlon, les reins et les poumons de chaque souris.

Afin d'évaluer la colonisation par *C. albicans* dans le tube digestif, une partie des organes récupérés est broyée dans 1mL de PBS et 100 µL d'homogénat sont déposés sur des géloses de Sabouraud afin de déterminer le nombre de CFU dans les différents organes. La lecture se fait après une incubation de 24h à 37°C. Les résultats sont exprimés en nombre de CFU par mg d'organe.

## **H. Evaluation histologique des lésions coliques induites par le DSS**

Au sacrifice, des fragments du côlon sont incubés dans 4% de paraformaldéhyde, toute la nuit à 4°C puis inclus dans la paraffine. Des coupes de 4µm d'épaisseur sont réalisées et colorées au May Grunwald Giemsa afin d'étudier l'architecture tissulaire et l'infiltrat inflammatoire. Le score histologique est déterminé selon l'importance de l'infiltrat leucocytaire et l'atteinte tissulaire.

## **I. Quantification des ARNm de cytokines pro-inflammatoires, de récepteurs de l'immunité innée et des protéines MBL**

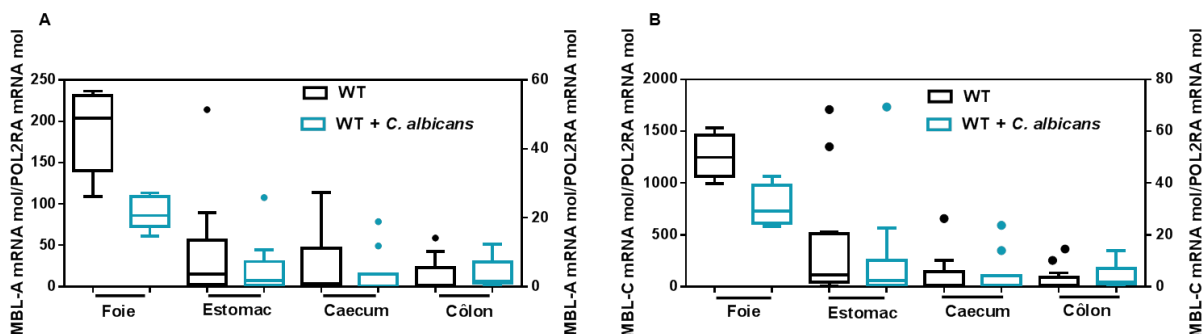
L'ARN total est isolé des cellules épithéliales de l'estomac, du caecum et du côlon grâce à un kit commercial (Nucleospin RNA, Macherey-Nagel®). La quantification d'ARN se fait par spectrophotométrie (Nanodrop; Nyxor biotech, France).

La phase de reverse transcription de l'ARNm en ADN complémentaire se fait dans un volume final de 20µL comprenant 1µg d'ARN (High capacity cDNA RT kit, Applied Biosystems). L'ADNc est amplifié par PCR en temps réel avec le kit Fast SYBR green (Applied Biosystems) en utilisant l'appareil One-step system (Applied Biosystems). Tous les résultats sont normalisés grâce au gène de référence POL2AR.

## VI. RESULTATS

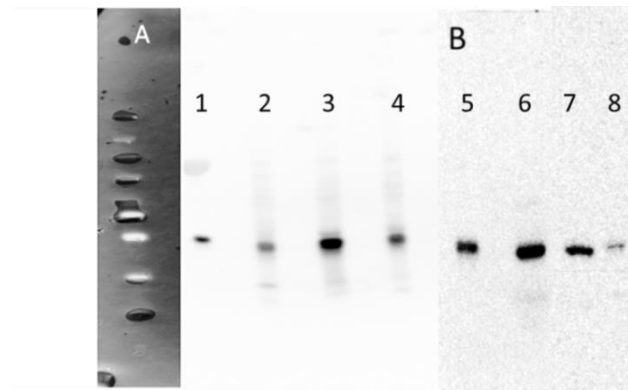
### A. MBL-A et MBL-C sont exprimées dans le tube digestif des souris C57BL/6

Afin d'étudier l'expression de la MBL dans les différents segments du tube digestif en réponse à une colonisation par *C. albicans*, nous avons réalisé une RT-PCR en temps réel sur l'ARNm des cellules épithéliales du foie, de l'estomac, du caecum et du côlon des souris C57BL/6 colonisées par *C. albicans* pendant 7 jours. L'ARNm de MBL-A et de MBL-C ont été détectés dans les cellules épithéliales des quatre organes des C57BL/6 colonisées et des souris contrôles (Fig. 9A et 9B). Le foie correspond à notre contrôle positif puisque c'est l'organe principal d'expression de la MBL. Par contre, les taux d'ARNm des deux formes de MBL n'étaient pas significativement différents entre les souris colonisées par *C. albicans* et les souris saines.



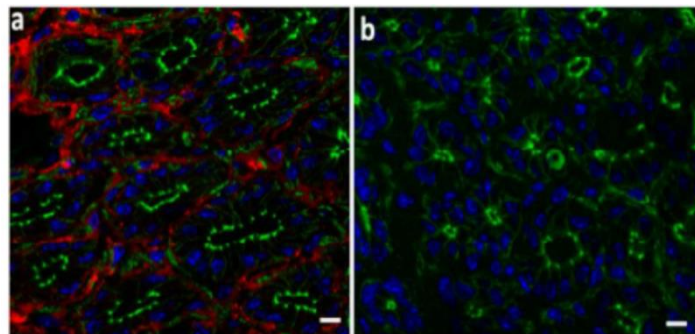
**Figure 9** : Expression de l'ARNm de MBL-A (A) et de MBL-C (B) dans le tube gastro-intestinal des souris C57BL/6 sauvages (WT) saines (noir) ou colonisées par *C. albicans* (bleu). L'ARN a été extrait des cellules épithéliales du foie, de l'estomac, du caecum et du côlon de souris saines (14 souris) et de souris colonisées par *C. albicans* (10 souris). L'ARNm a été amplifié par RT-PCR.

La technique de Western Blot a également confirmé la présence des protéines MBL-A et MBL-C dans l'estomac, le caecum et le côlon des souris saines ou colonisées par *C. albicans* (Fig. 10).



**Figure 10 :** Détection des protéines MBL-A (A) et MBL-C (B) (protéines de 32KDa) dans l'estomac (pistes 2 et 6), le caecum (pistes 3 et 7) et le côlon (pistes 4 et 8) des souris colonisées par *C. albicans*. L'estomac, le caecum et le côlon des souris ont été broyés dans du PBS puis les homogénats ont été utilisés pour détecter les protéines par Western Blot. Des protéines recombinantes de MBL-A (piste 1) et de MBL-C (piste 5) sont utilisées comme contrôle.

Pour explorer la localisation précise de l'expression de MBL dans l'estomac, nous avons réalisé des analyses par immunofluorescence sur les coupes histologiques. La protéine MBL-C a été détectée dans différentes parties de l'estomac et notamment au niveau de la muqueuse externe (Fig. 11).

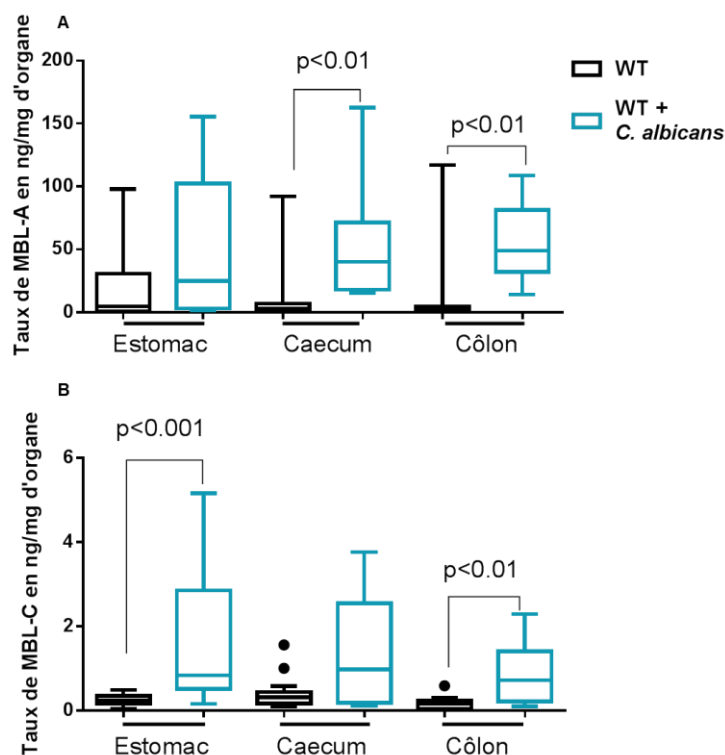


**Figure 11 :** Détection de la protéine MBL-C dans l'estomac des souris C57BL/6 colonisées par *C. albicans*. L'organe a été incubé toute la nuit à 4°C dans un bain de paraformaldéhyde puis inclut dans l'OCT. Des coupes de 10µm ont été réalisées à l'aide d'un cryostat. (a) La protéine MBL-C a été révélée grâce à un anticorps monoclonal anti-MBL-C (fluorescence rouge). Les cellules épithéliales sont marquées par de la phalloïdine (fluorescence verte). (b) Coupe contrôle pour vérifier la spécificité de l'anticorps secondaire.

Ces résultats mettent en évidence la production des deux protéines MBL-A et MBL-C par le tube digestif chez la souris. Cependant, nous ne savons pas si la colonisation par *C. albicans* module cette expression locale de MBL.

## **B. La colonisation par *C. albicans* augmente l'expression de MBL-A et de MBL-C dans le tube gastro-intestinal des souris**

Pour déterminer l'impact de la colonisation par *C. albicans* sur l'expression des protéines MBL-A et MBL-C dans l'intestin, des souris C57BL/6 sauvages ont été gavées avec un inoculum de  $10^{17}$  levures de *C. albicans* à J0. La colonisation a été suivie pendant 7 jours puis les souris ont été sacrifiées afin de récupérer l'estomac, le caecum et le côlon. Le nombre de CFU et le taux des deux protéines MBL sont déterminés pour chaque organe prélevé. Le nombre élevé de CFU dans les selles et les organes des souris à 7 jours montre que la colonisation est bien établie (résultats non présentés). Cette colonisation est corrélée avec des taux élevés de MBL-A et de MBL-C dans le tube digestif des souris colonisées. Ces taux sont significativement moins élevés chez les souris saines (Fig. 12). Par contre, les taux sériques de MBL ne varient pas entre les souris colonisées et les souris saines (résultats non présentés).



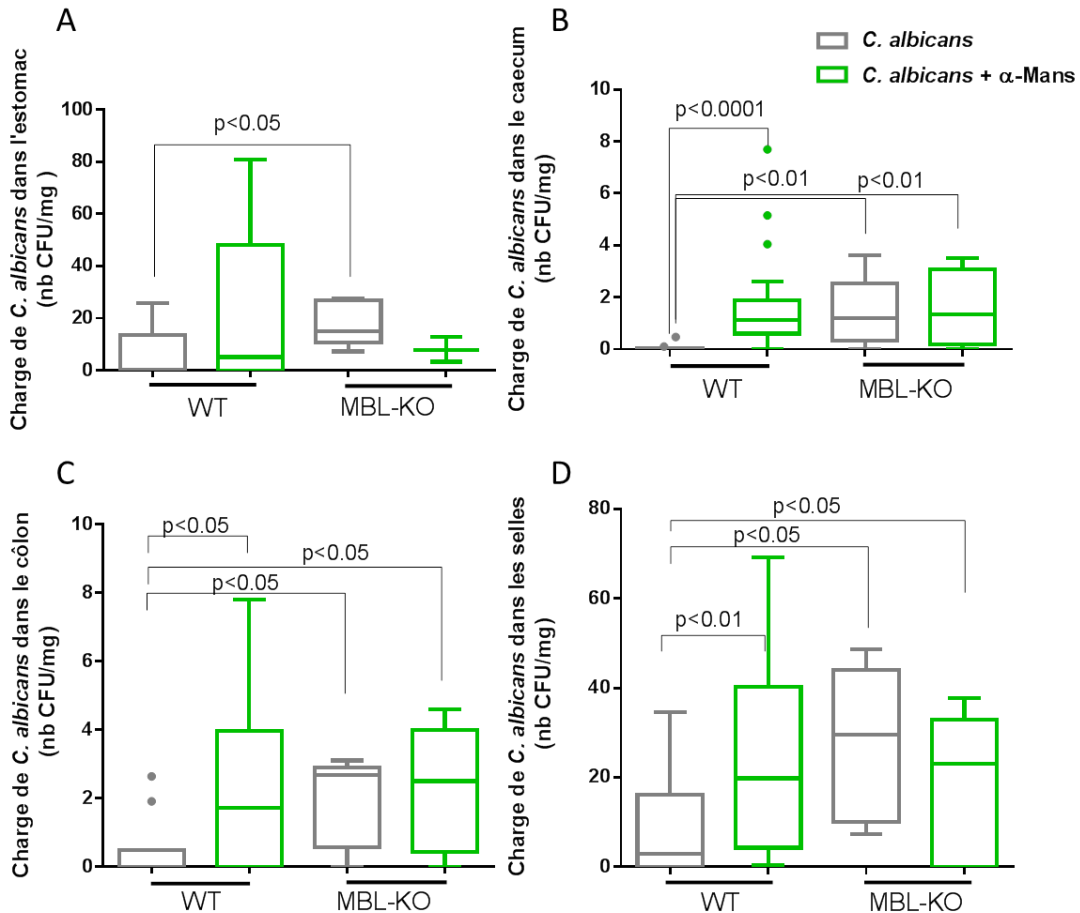
**Figure 12** : Quantification par technique ELISA de MBL-A (A) et de MBL-C (B) dans le tube digestif des souris C57BL/6 sauvages (WT) colonisées ou non par *C. albicans*. Après une colonisation de 7 jours par *C. albicans*, l'estomac, le caecum et le côlon des souris ont été broyés dans du PBS. Le taux des MBL présentes dans les homogénats d'organes de souris saines (noir) et de souris colonisées (bleu) est quantifié par technique ELISA.

### **C. L'opsonisation de *C. albicans* par la MBL est essentielle pour inhiber la colonisation des souris**

Les précédents résultats ont montré que la MBL pouvait être produite par le foie ou par les organes du tube digestif chez la souris et qu'une colonisation par *C. albicans* pouvait moduler cette production. Cependant nous ne savons pas si cette MBL d'origine digestive est impliquée dans l'élimination de *C. albicans* lors d'une colonisation.

Pour répondre à cette question, des souris C57BL/6 sauvages et des souris MBL-KO ont reçu par gavage un inoculum de *C. albicans* à J0 afin d'initier la colonisation et elles ont également reçu *per os* pendant 7 jours une dose d'un ligand de la MBL (mannane de *Saccharomyces cerevisiae*), capable de bloquer le CRD de la MBL.

L'administration du mannane a eu un impact significatif sur le nombre de CFU de *C. albicans* dans l'estomac, le caecum, le côlon et les selles des souris C57BL/6 sauvages par rapport aux souris non traitées (Fig. 13). Dans le modèle MBL-KO, l'administration du mannane n'influence pas le niveau de colonisation des souris. Ces résultats suggèrent qu'un blocage spécifique de la MBL favorise la colonisation par *C. albicans* dans le tube digestif des souris.

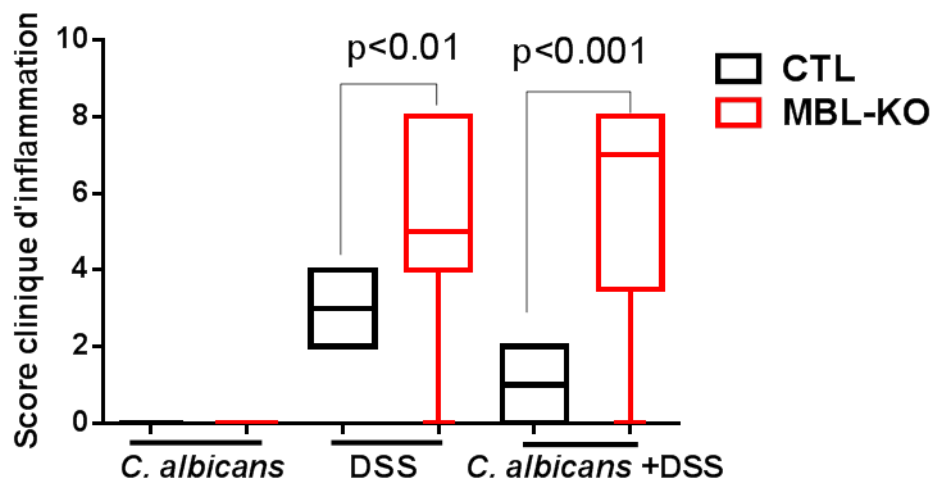


**Figure 13** : Détermination de la charge de *C. albicans* dans les organes de souris traitées (vert) ou non (gris) avec le mannane ( $\alpha$ -Mans). 29 souris C57BL/6 sauvages (WT) et 10 souris MBL-KO ont été colonisées avec *C. albicans*. Parmi ces souris, 19 souris sauvages et 5 souris MBL-KO ont reçu une dose unique de ligand pendant 7 jours afin de bloquer le CRD de la MBL. L'estomac (A), le caecum (B), le côlon (C) et les selles (D) ont été broyés dans du PBS puis déposés sur des géloses de Sabouraud afin de déterminer le nombre de CFU. La lecture se fait après une incubation de 24h à 37°C. L'expérience a été réalisée à deux reprises.

## D. Le déficit en MBL exacerbe l'inflammation intestinale et la colonisation digestive par *C. albicans*

Afin de confirmer l'implication de la MBL dans la colonisation par *C. albicans*, nous avons utilisé des souris C57BL/6 pour lesquelles les deux gènes de la MBL ont été délétés (MBL-KO). Ces souris ont également été utilisées pour déterminer le rôle de la MBL dans la régulation de l'homéostasie intestinale et des pathologies coliques grâce à un traitement par DSS qui mime les maladies inflammatoires du tube digestif humain.

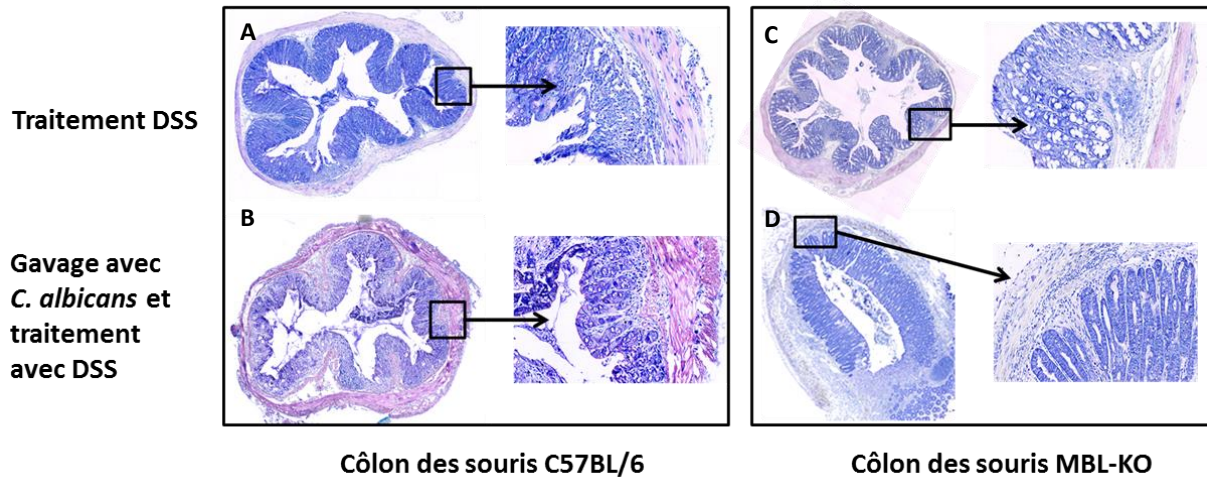
Des souris MBL-KO et des souris C57BL/6 sauvages (fond génétique des souris MBL-KO) ont reçu un inoculum de *C. albicans* à J0 et un traitement par DSS pendant 14 jours afin d'induire une colite chimio-induite. Tous les jours, les saignements rectaux et la consistance des selles ont été évalués afin de déterminer le score clinique de chaque souris. Nous n'avons observé aucune différence significative de score clinique chez les deux groupes de souris recevant uniquement *C. albicans* (Fig. 14). Par contre après traitement par DSS, le score clinique des souris MBL-KO est significativement plus élevé que celui des souris C57BL/6 sauvages (Fig. 14). L'inflammation observée cliniquement chez les souris semble indépendante de la colonisation par *C. albicans*.



**Figure 14** : Score clinique des souris MBL-KO (rouge) et des souris C57BL/6 contrôles (noir). Pour cette expérience, 20 souris contrôles et 23 souris MBL-KO ont reçu un inoculum de *C. albicans* ( $10^{17}$ ) à J0, 10 souris contrôles et 14 souris MBL-KO ont été traitées avec du DSS (1.5%) pendant 14 jours, 10 souris contrôles et 14 souris MBL-KO ont reçu le même inoculum de *C. albicans* et le même traitement par DSS. Le score clinique a été déterminé quotidiennement sur une échelle allant de 0 (aucun signe) à 8 (atteinte

grave) en tenant compte de différents paramètres comme: l'état général de la souris (signe de prostration ou de douleur physique évidente), la consistance des selles et la présence de sang dans les selles.

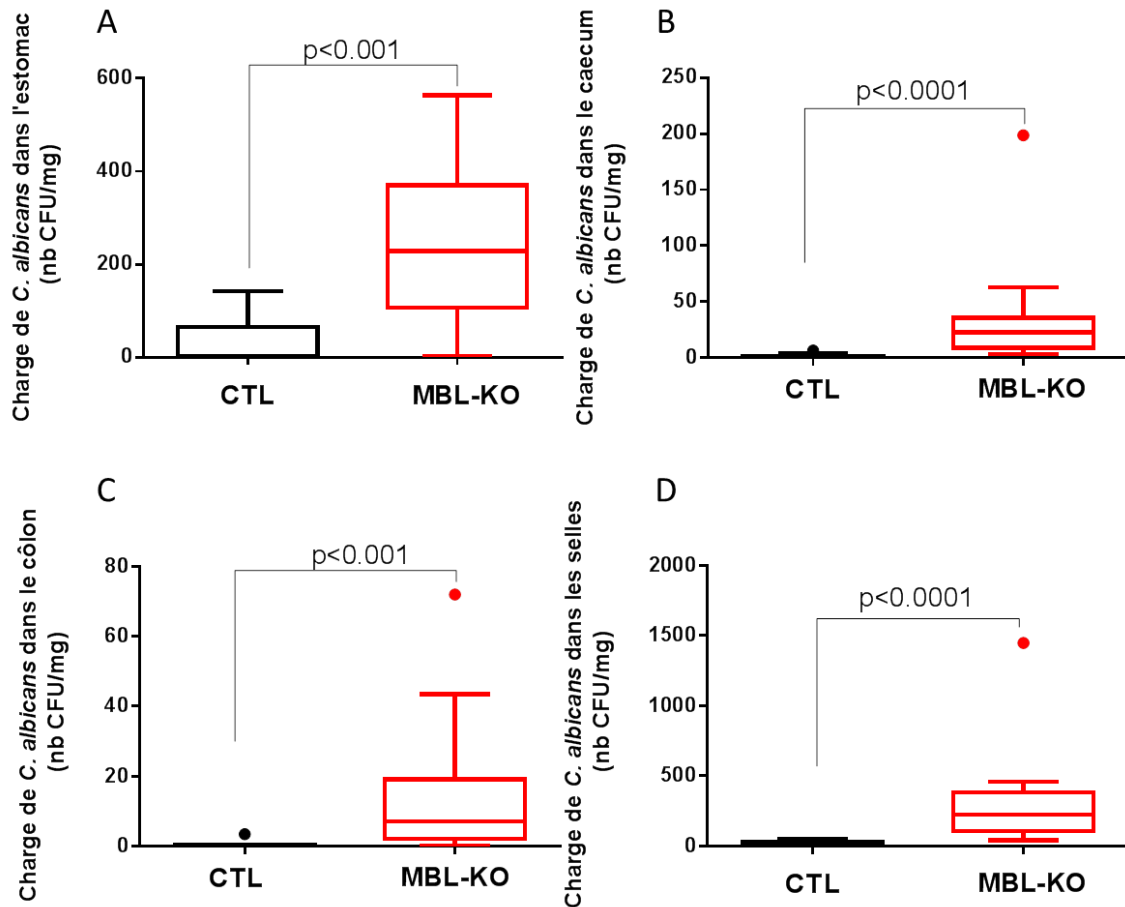
Les coupes histologiques de côlon ont montré une importante infiltration leucocytaire et des dommages au niveau du tissu épithélial pour les souris MBL-KO, en comparaison aux côlons des souris sauvages (Fig. 15).



**Figure 15** : Coupes histologiques de côlon de souris C57BL/6 contrôles (A, B) et de souris MBL-KO (C, D) colorées au May-Grunwald Giemsa. Toutes les souris ont reçu du DSS (1.5%) pendant 14 jours. Les souris du panel B et D ont reçu un gavage par *C. albicans* ( $10^{17}$ ) à J0. Au sacrifice à J14, les côlons ont été inclus en paraffine et des coupes de 4 $\mu$ m d'épaisseur ont été réalisées.

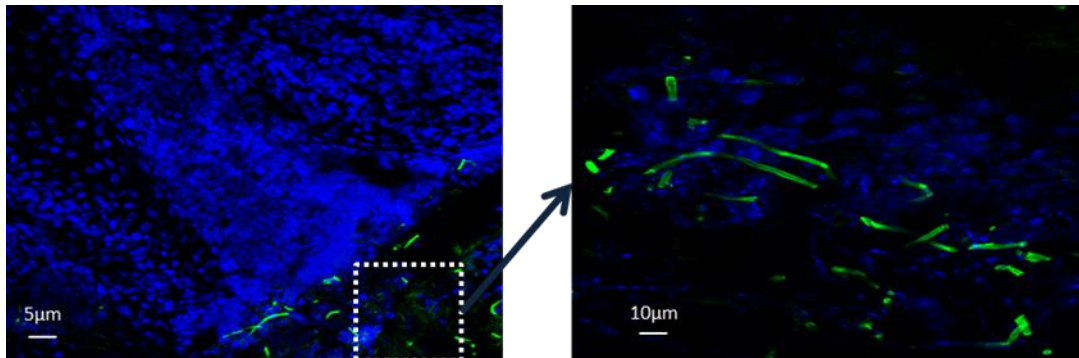
Pour évaluer la colonisation des souris par *C. albicans* au cours du temps, le nombre de CFU dans les selles a été déterminé chaque jour pendant 14 jours. La colonisation le long du tube digestif a pu être déterminée après sacrifice dans l'estomac, le caecum et le côlon. Le nombre de CFU était plus important dans les selles et dans le tube digestif des souris MBL-KO par rapport à ceux des souris sauvages (Fig.16).





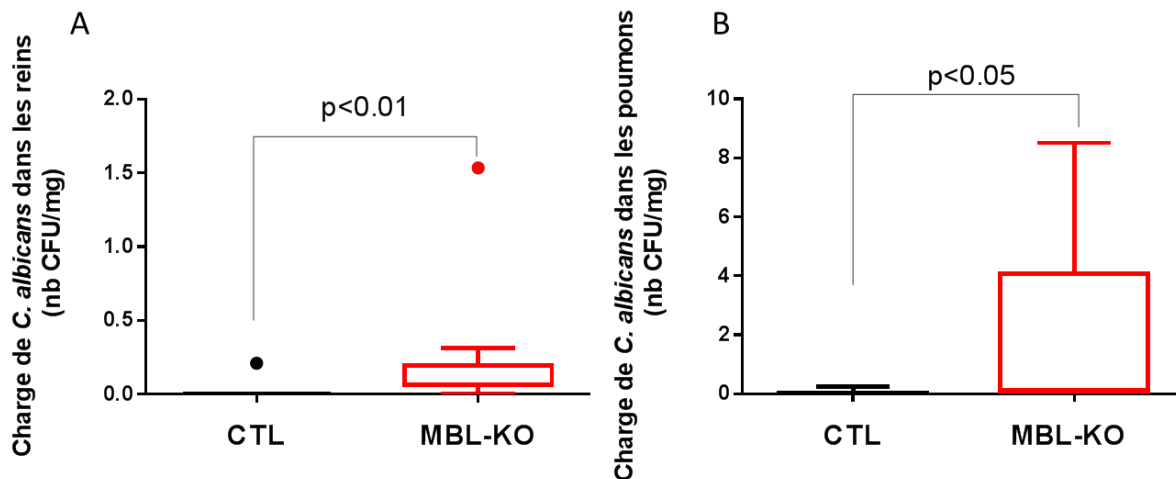
**Figure 16 :** Evaluation de la colonisation par *C. albicans* dans le tube digestif des souris C57BL/6 contrôles (noir) et des souris MBL-KO (rouge) après traitement par DSS durant 14 jours. 10 souris contrôles et 14 souris MBL-KO ont reçu un inoculum de  $10^{17}$  cellules de *C. albicans* à J0 et un traitement par DSS (1.5%) pendant 14 jours. Après sacrifice, l'estomac (A), le caecum (B), le côlon (C) et les selles (D) ont été broyés dans du PBS et ensemencés sur gélose de Sabouraud. Le nombre de CFU est déterminé après 24h d'incubation à 37°C.

Ces résultats sont confirmés en microscopie confocale par la présence de nombreux hyphes et blastoconidies de *C.albicans* dans la lumière et sur l'épithélium de l'estomac (Fig.17).



**Figure 17 :** Mise en évidence de *C. albicans* en microscopie confocale dans l'estomac des souris MBL-KO. Les fragments d'estomac ont été incubés toute la nuit à 4°C dans du paraformaldéhyde puis ils ont été inclus dans de l'OCT. Des coupes de 10µm d'épaisseur ont été utilisées pour la détection de *C. albicans* par un anticorps fluorescent spécifique.

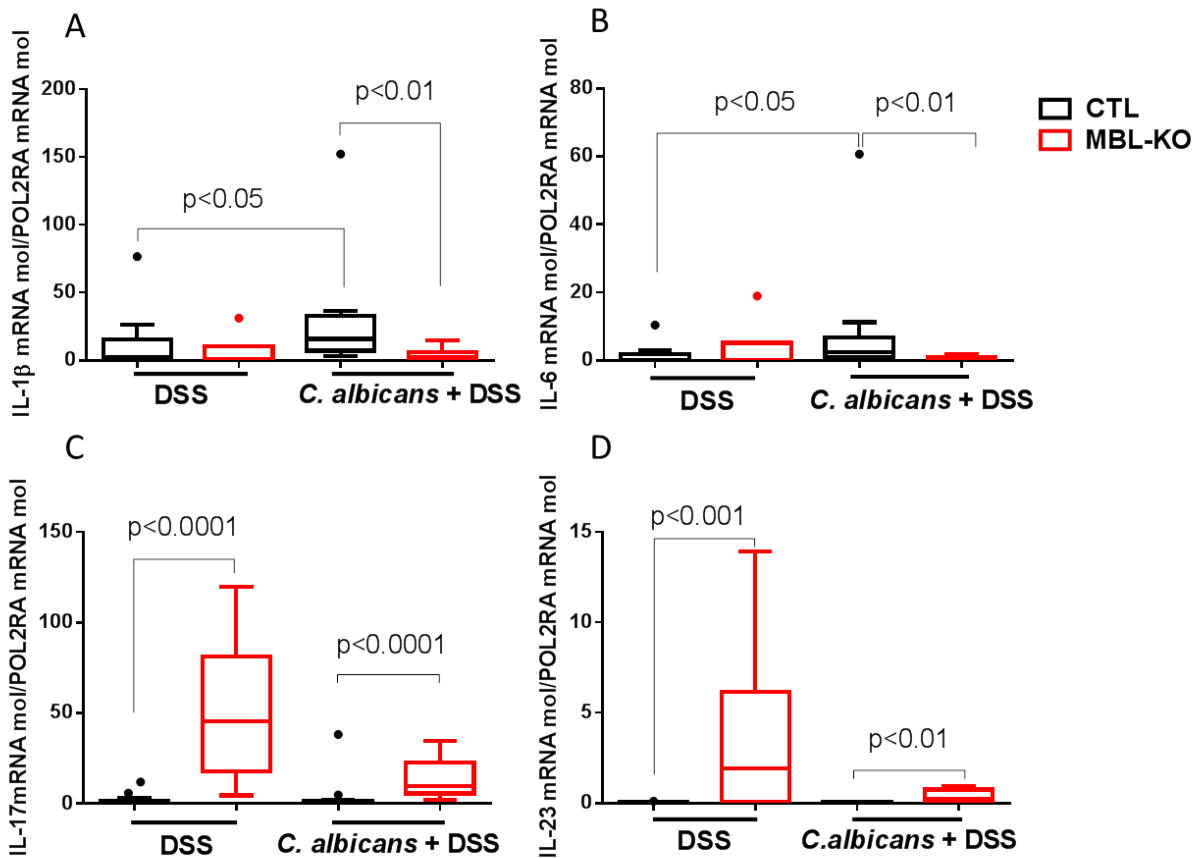
De plus, une dissémination de *C. albicans* a été observée au niveau des poumons et des reins des souris MBL-KO traitées par DSS alors que *C. albicans* ne dissémine pas chez les souris contrôles (Fig. 18).



**Figure 18:** Détermination de la dissémination de *C. albicans* chez les souris C57BL/6 contrôles (noir) et les souris MBL-KO (rouge) après un traitement par DSS (1.5%) de 14 jours. 10 souris contrôles et 14 souris MBL-KO ont reçu un inoculum de  $10^{17}$  levures de *C. albicans* à J0 et un traitement par DSS pendant 14 jours. Après sacrifice, les reins et les poumons ont été broyés dans du PBS et une culture sur Sabouraud pendant 24h à 37°C a permis de déterminer le nombre de CFU.

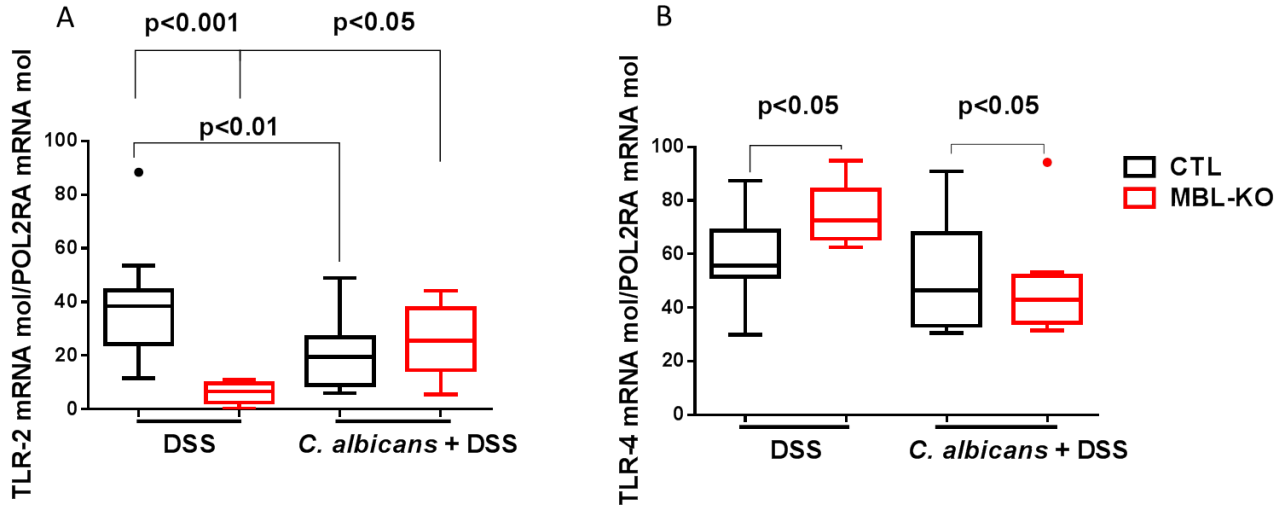
## **E. La MBL régule l'expression des cytokines pro-inflammatoires et des récepteurs de l'immunité innée au niveau du côlon**

Afin de comprendre les mécanismes par lesquels la MBL régule la réponse inflammatoire lors d'une colite chimio-induite associée à une colonisation par *C. albicans*, l'expression des cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17 et IL-23 a été mesurée dans le côlon des souris MBL-KO et des souris contrôles colonisées par *C. albicans* et traitées par DSS. Lors du traitement par DSS seul, l'expression des ARNm des cytokines IL- $\beta$  et IL-6 est plus importante chez les souris C57BL/6 sauvages que chez les souris MBL-KO. En présence d'un traitement par DSS et d'une colonisation à *C. albicans*, cette expression augmente chez les souris contrôles mais paradoxalement elle reste stable chez les souris MBL-KO (Fig. 19A et 19B). Au contraire, l'expression des ARNm des cytokines IL-17 et IL-23 sont significativement plus élevés chez les souris MBL-KO traitées par DSS mais cette augmentation est inhibée par la colonisation par *C. albicans* (Fig. 19C et 19D).

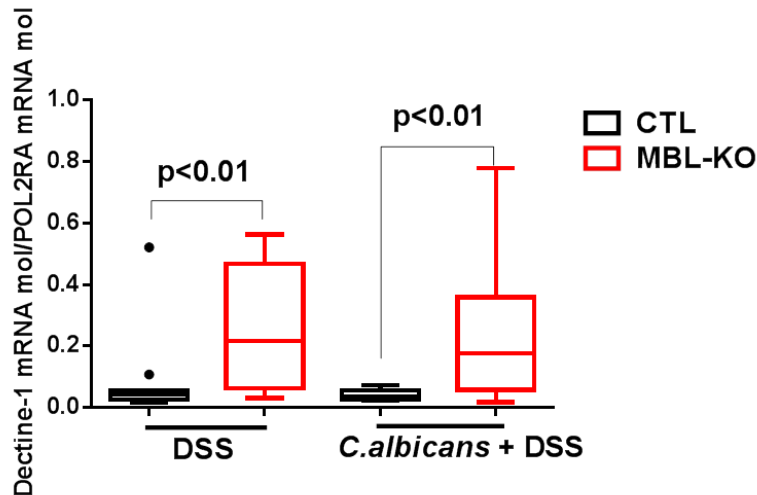


**Figure 19 :** Expression des cytokines pro-inflammatoires dans le côlon des souris C57BL/6 contrôles (noir) et des souris MBL-KO (rouge) traitées par DSS. 29 souris contrôles et 22 souris MBL-KO ont reçu du DSS pendant 14 jours. Parmi ces souris, 15 souris contrôles et 13 MBL-KO ont reçu un inoculum de *C. albicans* à J0. L'ARNm des cellules épithéliales du côlon a été extrait et les ARNm des cytokines IL1- $\beta$  (A), IL-6 (B), IL-17 (C) et IL-23 (D) ont été amplifiés par RT-PCR.

Au niveau des récepteurs membranaires de l'immunité innée, nous avons déterminé les taux d'expression des récepteurs TLR-2, TLR-4 et Dectine-1 dans le côlon de souris. Après traitement par DSS, l'expression des récepteurs Dectine-1 et TLR-4 est augmentée dans le côlon des souris MBL-KO par rapport à celui des souris contrôles. Par contre, l'expression du récepteur TLR-2 dans les mêmes conditions est inhibée chez les souris MBL-KO (Fig. 20A). Comparées aux souris non génétiquement modifiées, les souris MBL-KO colonisées par *C. albicans* présentent des taux augmentés d'ARNm de TLR-2, des taux diminués d'ARNm de TLR-4 et des taux stables d'ARNm de Dectine-1 (Fig. 20 et 21).



**Figure 20** : Expression des récepteurs TLR-2 et TLR-4 dans le côlon de souris C57BL/6 contrôles (noir) et de souris MBL-KO (rouge) traitées par DSS. 20 souris contrôles et 16 souris MBL-KO ont reçu du DSS pendant 14 jours. Parmi ces souris, 10 souris contrôles et 10 souris MBL-KO ont reçu un inoculum de  $10^{17}$  levures de *C. albicans* à J0. L'ARNm des cellules épithéliales du côlon a été extrait et les ARNm des récepteurs TLR-2 (A) and TLR-4 (B) ont été amplifiés par RT-PCR.



**Figure 21** : Expression du récepteur Dectine-1 dans le côlon de souris C57BL/6 contrôles (noir) et de souris MBL-KO (rouge) traitées par DSS. 27 souris contrôles et 22 souris MBL-KO ont reçu du DSS pendant 14 jours. Parmi ces souris, 13 souris contrôles et 13 souris MBL-KO ont reçu un inoculum de  $10^{17}$  levures de *C. albicans* à J0. L'ARNm des cellules épithéliales du côlon a été extrait et l'ARNm du récepteur Dectine-1 a été amplifié par RT-PCR.

## VII. DISCUSSION

La MBL est un récepteur PRR soluble, produit principalement par le foie et capable d'activer la voie lectinique du complément après reconnaissance des pathogènes. Les déficits en MBL sont associés à de nombreuses maladies infectieuses dont les infections fongiques (116). Il est admis grâce aux résultats de la littérature que la MBL sérique, produite par le foie, joue un rôle essentiel dans la défense de l'hôte contre les candidoses invasives. Cependant, peu d'études ont concerné son rôle dans l'homéostasie intestinale et la défense contre la colonisation par *C. albicans*.

L'un des premiers buts de cette étude était de déterminer si, en plus d'une production hépatique, la MBL était également produite par les cellules épithéliales du tube digestif en réponse à une colonisation par *C. albicans*. En cohérence avec les résultats d'autres équipes, nous avons détecté l'ARNm et les protéines MBL-A/MBL-C dans les cellules épithéliales du tube digestif des souris C57BL/6 sauvages (23). Dans cette étude, nous avons aussi pu montrer que la colonisation par *C. albicans* est capable d'induire la production de MBL-A et de MBL-C par les cellules épithéliales, favorisant ainsi l'élimination de la levure alors que les taux sériques de MBL ne varient pas (données non montrées). La MBL-C est préférentiellement exprimée dans l'estomac et le côlon alors que les taux de MBL-A sont plus élevés dans le caecum et le côlon. Un dosage des taux de MBL dans le broyat des organes digestifs de souris C57BL/6 sauvages colonisées par *C. albicans* et traitées par DSS n'a pas montré de différence par rapport aux souris colonisées par *C. albicans* mais non traitées par du DSS. La production de MBL est donc induite par la reconnaissance de *C. albicans* et non par l'inflammation intestinale. Ces résultats sont cohérents avec les études cliniques qui montrent que les patients candidémiques ont des taux sériques élevés de MBL (8). L'administration du mannane par voie orale aux souris en tant que ligand du CRD de la MBL digestive, a pour conséquence de favoriser la colonisation des muqueuses par *C. albicans*.

Les résultats de cette première partie montrent donc que la MBL a un rôle essentiel dans le contrôle de la colonisation par *C. albicans* mais nous ne connaissons pas son impact sur l'inflammation intestinale. Il nous a donc paru important d'étudier

l'homéostasie intestinale dans un modèle de colite inflammatoire chez des souris invalidées pour les gènes *MBL* et colonisées par *C. albicans*.

Ces souris ont subi un traitement par DSS afin d'induire une colite chimio-induite qui mime les lésions histologiques observées au cours de la MC humaine. En l'absence d'inflammation intestinale, la colonisation par *C. albicans* est plus importante chez les souris MBL-KO que chez les souris contrôles. Cela confirme le rôle essentiel de la MBL dans la limitation de la colonisation par *C. albicans*. L'induction de l'inflammation intestinale favorise aussi bien la colonisation digestive que la dissémination de *C. albicans* dans les reins et les poumons des souris MBL-KO. L'inflammation intestinale constitue donc un facteur favorisant la colonisation et la dissémination par *C. albicans* dans un contexte de déficit en MBL.

En l'absence d'une colonisation par *C. albicans*, les souris MBL-KO sont plus sensibles à l'inflammation intestinale chimio-induite que les souris témoins. Ces résultats sont cohérents avec les études cliniques montrant une relation entre le phénotype sévère de la maladie et un déficit en MBL (10). Un dosage des marqueurs cytokiniques nous a permis de mieux comprendre l'effet modulateur de la MBL sur la réponse inflammatoire. En effet, la MBL peut moduler positivement l'expression des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-6, cytokines importantes dans le développement de l'inflammation intestinale. Lors de la MC, ces deux cytokines augmentent au niveau de la muqueuse colique (117,118). Ces résultats sont similaires à ceux obtenus en présence de monocytes dont l'expression d'IL-1 $\beta$  et d'IL-6 est régulée par la MBL (119,120). Nos résultats mettent en évidence une augmentation de l'expression de ces deux cytokines par une colonisation par *C. albicans* chez les souris témoins traitées par DSS contrairement aux souris MBL-KO. La MBL pourrait donc être impliquée dans la promotion des cytokines IL-1 $\beta$  et IL-6 lors de l'inflammation intestinale et lors de la colonisation par *C. albicans*, pouvant ainsi exacerber l'inflammation associée à la MC.

Parallèlement, l'expression des cytokines IL-17 et IL-23 (témoins d'une réponse Th17) est significativement augmentée dans le côlon des souris MBL-KO traitées par DSS en comparaison aux souris contrôles. Ces résultats suggèrent que la MBL prévient une réponse inflammatoire excessive en inhibant la réponse des lymphocytes Th17 et

en favorisant celle des Th1 (121). Cette activité est similaire à celle du mannose récepteur (MR) ou du récepteur DC-SIGN.

Dans plusieurs études, l'augmentation de l'expression des cytokines IL-17 et IL-23 est essentielle au développement d'une inflammation chronique de la muqueuse. Cette augmentation favorise la réponse inflammatoire lymphocytaire intraépithéliale et la cytotoxicité (122). Un déficit en MBL pourrait donc favoriser la réponse Th17 et entretenir l'inflammation chronique intestinale.

Beaucoup de conséquences inflammatoires dues à l'interaction de *C. albicans* avec l'hôte, sont médiées par les PRRs, tels que les TLR, Dectine-1 ou la MBL. Dans notre modèle d'étude, le traitement par DSS entraîne une augmentation de l'expression des récepteurs TLR-4 et Dectine-1 et une diminution du récepteur TLR-2 au niveau du côlon des souris MBL-KO par rapport à celui des souris contrôles. Il a été rapporté que l'activation de Dectine-1 induit une production d'IL-17 et d'IL-23 par les cellules dendritiques (123). L'augmentation d'IL-17 et d'IL-23 observée lors d'un déficit en MBL serait probablement en lien avec une surexpression du récepteur Dectine-1. De plus, l'induction d'une colonisation par *C. albicans* chez ces souris traitées au DSS, va induire une augmentation du récepteur TLR-2 chez les souris MBL-KO alors que l'expression des deux autres récepteurs est stable. Il est connu que TLR-2 est capable de reconnaître certains résidus mannosylés de *C. albicans* ou de coopérer avec d'autres récepteurs PRRs (Galectine-3) pour induire une réponse pro-inflammatoire (59,76). Ces résultats suggèrent donc qu'un déficit en MBL peut être compensé par une surexpression de TLR-2 lors d'une interaction *C. albicans*-hôte.

Toutes les conclusions énoncées dans ce travail sont fondées sur l'interprétation des résultats obtenus chez la souris. Leur relevance clinique mérite cependant d'être vérifiée sur des échantillons humains afin de préciser le rôle de la MBL dans le maintien/déclenchement de l'inflammation associée à la MC. Contrairement aux travaux de Muller et al., une étude pilote menée au sein du laboratoire et utilisant une lignée issue des cellules colorectales humaines (la lignée Caco-2) a mis en évidence l'expression de l'ARNm de *MBL2* après stimulation par différents agonistes de PPAR $\gamma$  (92). Ce qui suggère que la MBL peut être produite par la muqueuse digestive humaine. Nous avons donc décidé de tester l'expression de *MBL2* des prélèvements de



muqueuse d'estomac et de côlon, en collaboration avec le service d'endoscopie du CHRU de Lille (Pr. Mathurin). Faute de matériel suffisant, il nous a pas été possible de révéler l'expression d'ARNm ni de protéines sur les fragments de biopsie. L'utilisation de tissus provenant du bloc opératoire de chirurgie digestive (déchets opératoires) a permis de mettre en évidence une expression d'ARNm et de protéine MBL dans les cellules épithéliales coliques après stimulation par *C. albicans* et par des agonistes de PPAR $\gamma$ .

La MBL module donc l'homéostasie intestinale, notamment dans un contexte inflammatoire. Il est donc vraisemblable que la réponse inflammatoire des patients ayant un déficit MBL soit différente de celle observée chez les patients ayant un taux sérique normal. Le statut génétique des patients pour le gène *MBL2* pourrait donc avoir un impact sur l'issue d'un traitement anti-inflammatoire, notamment lors de l'usage des biothérapies ciblant la réponse Th17. Des essais récents ont été menés sur le traitement de la MC avec des anticorps monoclonaux anti IL-17 comme le Secukinumab (Cosentyx®). Ces essais ont démontré un effet indésirable de ces anticorps pouvant mener à une aggravation de la maladie (125). Cette inefficacité du Secukinumab serait due, selon les auteurs, à la présence de *C. albicans* chez les patients qui serait responsable d'une perte de contrôle de la réponse IL-17 (126). Il est également possible que la surexpression d'IL-17 observée lors d'un déficit en MBL perturbe l'action de cet anticorps, rendant son utilisation inappropriée.

## VIII. CONCLUSION

Nos travaux montrent, pour la première fois, que la MBL est exprimée dans les cellules épithéliales du tube digestif de souris en réponse à un stimulus par *C. albicans*, indépendamment de l'inflammation colique chimio-induite. Nos résultats mettent en évidence le rôle essentiel de la MBL dans la défense contre la colonisation à *C. albicans*, réduisant ainsi le risque de dissémination hématogène. Ils montrent également que la MBL est cruciale pour la régulation de l'inflammation intestinale en modulant la réponse Th1/Th17 et l'expression de certains récepteurs PRRs. En relation avec les deux hypothèses émises dans le chapitre « Introduction », nos résultats soutiennent, en réalité, qu'un déficit en MBL favorise d'une part la colonisation par *C. albicans* et participe à l'aggravation de l'inflammation intestinale lors d'une colite chimio-induite, d'autre part. Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension de la physiopathologie des candidoses disséminées mais également dans la régulation de l'homéostasie intestinale. Nous explorons actuellement, chez l'Homme, la relation entre l'expression digestive de la MBL et la colonisation fongique, ainsi que l'impact du polymorphisme de gène *MBL2* sur le phénotype de la MC.

## IX. BIBLIOGRAPHIE

1. Standaert-Vitse, A., et al. (2006) Candida albicans is an immunogen for anti-Saccharomyces cerevisiae antibody markers of Crohn's disease. *Gastroenterology* **130**, 1764-75
2. Sendid, B., et al. (2008) Antibodies against glucan, chitin, and Saccharomyces cerevisiae mannan as new biomarkers of Candida albicans infection that complement tests based on C. albicans mannan. *Clin Vaccine Immunol* **15**, 1868-77
3. Sendid, B., et al. (1996) Specific antibody response to oligomannosidic epitopes in Crohn's disease. *Clin Diagn Lab Immunol* **3**, 219-26
4. Standaert-Vitse, A., et al. (2009) Candida albicans colonization and ASCA in familial Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* **104**, 1745-53
5. Jawhara, S., et al. (2008) Colonization of mice by Candida albicans is promoted by chemically induced colitis and augments inflammatory responses through galectin-3. *J Infect Dis* **197**, 972-80
6. Dam, T. K., et al. (2010) Lectins as pattern recognition molecules: the effects of epitope density in innate immunity. *Glycobiology* **20**, 270-9
7. Damiens, S., et al. (2013) Characterization of the recognition of Candida species by mannose-binding lectin using surface plasmon resonance. *Analyst* **138**, 2477-82
8. Damiens, S., et al. (2012) Mannose-binding lectin levels and variation during invasive candidiasis. *J Clin Immunol* **32**, 1317-23
9. Bak-Romaniszyn, L., et al. (2011) Mannan-binding lectin deficiency in pediatric patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* **46**, 1275-8
10. Schoepfer, A. M., et al. (2009) Low Mannan-binding lectin serum levels are associated with complicated Crohn's disease and reactivity to oligomannan (ASCA). *Am J Gastroenterol* **104**, 2508-16
11. Ip, W. K., et al. (2009) Mannose-binding lectin and innate immunity. *Immunol Rev* **230**, 9-21
12. Miller, A., et al. (2012) Near-planar solution structures of mannose-binding lectin oligomers provide insight on activation of lectin pathway of complement. *J Biol Chem* **287**, 3930-45
13. Kjaer, T. R., et al. (2013) Toward a structure-based comprehension of the lectin pathway of complement. *Mol Immunol* **56**, 222-31
14. Hansen, S., et al. (2000) Purification and characterization of two mannan-binding lectins from mouse serum. *J Immunol* **164**, 2610-8
15. Degn, S. E., et al. (2009) MASP-2, a human protein associated with pattern recognition molecules of the complement system and regulating the lectin pathway of complement activation. *J Immunol* **183**, 7371-8
16. Skjoedt, M. O., et al. (2010) A novel mannose-binding lectin/ficolin-associated protein is highly expressed in heart and skeletal muscle tissues and inhibits complement activation. *J Biol Chem* **285**, 8234-43
17. Duncan, R. C., et al. (2012) Multiple domains of MASP-2, an initiating complement protease, are required for interaction with its substrate C4. *Mol Immunol* **49**, 593-600
18. Wallis, R., et al. (2004) Localization of the serine protease-binding sites in the collagen-like domain of mannose-binding protein: indirect effects of naturally occurring mutations on protease binding and activation. *J Biol Chem* **279**, 14065-73
19. Kjaer, T. R., et al. (2013) M-ficolin binds selectively to the capsular polysaccharides of Streptococcus pneumoniae serotypes 19B and 19C and of a Streptococcus mitis strain. *Infect Immun* **81**, 452-9
20. Degn, S. E., et al. (2012) Mannan-binding lectin-associated serine protease (MASP)-1 is crucial for lectin pathway activation in human serum, whereas neither MASP-1 nor MASP-3 is required for alternative pathway function. *J Immunol* **189**, 3957-69
21. Seyfarth, J., et al. (2006) Extra-hepatic transcription of the human mannose-binding lectin gene (mbl2) and the MBL-associated serine protease 1-3 genes. *Mol Immunol* **43**, 962-71
22. Tachibana, K., et al. (2013) Human mannose-binding lectin 2 is directly regulated by peroxisome proliferator-activated receptors via a peroxisome proliferator responsive element. *J Biochem* **154**, 265-73
23. Uemura, K., et al. (2002) L-MBP is expressed in epithelial cells of mouse small intestine. *J Immunol* **169**, 6945-50
24. Héja, D., et al. (2012) Revised mechanism of complement lectin-pathway activation revealing the role of serine protease MASP-1 as the exclusive activator of MASP-2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 10498-503
25. Li, D., et al. (2012) MBL-mediated opsonophagocytosis of Candida albicans by human neutrophils is coupled with intracellular Dectin-1-triggered ROS production. *PLoS One* **7**, e50589
26. Ghiran, I., et al. (2000) Complement receptor 1/CD35 is a receptor for mannose-binding lectin. *J Exp Med* **192**, 1797-808
27. Ip, W. K., et al. (2008) Mannose-binding lectin enhances Toll-like receptors 2 and 6 signaling from the phagosome. *J Exp Med* **205**, 169-81
28. Naito, H., et al. (1999) Characterization of human serum mannose-binding protein promoter. *J Biochem* **126**, 1004-12
29. Stover, C. M., et al. (2003) Murine serine proteases MASP-1 and MASP-3, components of the lectin pathway activation complex of complement, are encoded by a single structural gene. *Genes Immun* **4**, 374-84
30. Dahl, M. R., et al. (2001) MASP-3 and its association with distinct complexes of the mannose-binding lectin complement activation pathway. *Immunity* **15**, 127-35
31. Stover, C. M., et al. (2004) Organization of the MASP2 locus and its expression profile in mouse and rat. *Mamm Genome* **15**, 887-900
32. Bernig, T., et al. (2004) Sequence analysis of the mannose-binding lectin (MBL2) gene reveals a high degree of heterozygosity with evidence of selection. *Genes Immun* **5**, 461-76
33. Heitzeneder, S., et al. (2012) Mannan-binding lectin deficiency - Good news, bad news, doesn't matter? *Clin Immunol* **143**, 22-38
34. Garred, P. (2008) Mannose-binding lectin genetics: from A to Z. *Biochem Soc Trans* **36**, 1461-6
35. Minchinton, R. M., et al. (2002) Analysis of the relationship between mannose-binding lectin (MBL) genotype, MBL levels and function in an Australian blood donor population. *Scand J Immunol* **56**, 630-41
36. Thiel, S., et al. (2007) Deficiency of mannose-binding lectin associated serine protease-2 due to missense polymorphisms. *Genes Immun* **8**, 154-63

37. Thiel, S., et al. (2009) Polymorphisms in mannan-binding lectin (MBL)-associated serine protease 2 affect stability, binding to MBL, and enzymatic activity. *J Immunol* **182**, 2939-47
38. Phaneuf, L. R., et al. (2007) Single nucleotide polymorphisms in mannan-binding lectins and ficolins in various strains of mice. *Int J Immunogenet* **34**, 259-67
39. van Till, J. W., et al. (2008) Mannose-binding lectin deficiency facilitates abdominal *Candida* infections in patients with secondary peritonitis. *Clin Vaccine Immunol* **15**, 65-70
40. Perleth, J., et al. (2007) Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* **45**, 321-46
41. Sheppard, D. C., et al. (2004) Functional and structural diversity in the Als protein family of *Candida albicans*. *J Biol Chem* **279**, 30480-9
42. Finkel, J. S., et al. (2011) Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol* **9**, 109-18
43. Gow, N. A., et al. (2012) *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* **10**, 112-22
44. Moreno-Ruiz, E., et al. (2009) *Candida albicans* internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Cell Microbiol* **11**, 1179-89
45. Dalle, F., et al. (2010) Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol* **12**, 248-71
46. Krysan, D. J., et al. (2014) Catching fire: *Candida albicans*, macrophages, and pyroptosis. *PLoS Pathog* **10**, e1004139
47. Naglik, J. R., et al. (2003) *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 400-28, table of contents
48. Niewerth, M., et al. (2001) Phospholipases of *Candida albicans*. *Mycoses* **44**, 361-7
49. Villar, C. C., et al. (2007) Mucosal tissue invasion by *Candida albicans* is associated with E-cadherin degradation, mediated by transcription factor Rim101p and protease Sap5p. *Infect Immun* **75**, 2126-35
50. Aguin, T. J., et al. (2015) Vulvovaginal candidiasis in pregnancy. *Curr Infect Dis Rep* **17**, 462
51. Berberi, A., et al. (2015) Epidemiology of Oropharyngeal Candidiasis in Human Immunodeficiency Virus/Acquired Immune Deficiency Syndrome Patients and CD4+ Counts. *J Int Oral Health* **7**, 20-3
52. Ortega, M., et al. (2011) *Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008. *J Hosp Infect* **77**, 157-61
53. Tortorano, A. M., et al. (2006) *Candidaemia* in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* **27**, 359-66
54. Kojic, E. M., et al. (2004) *Candida* infections of medical devices. *Clin Microbiol Rev* **17**, 255-67
55. Bassetti, M., et al. (2013) *Candidaemia* in internal medicine departments: the burden of a rising problem. *Clin Microbiol Infect* **19**, E281-4
56. Marklein, G., et al. (2009) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and reliable identification of clinical yeast isolates. *J Clin Microbiol* **47**, 2912-7
57. Sendid, B., et al. (2003) Contribution of the Platelia *Candida*-specific antibody and antigen tests to early diagnosis of systemic *Candida tropicalis* infection in neutropenic adults. *J Clin Microbiol* **41**, 4551-8
58. Sendid, B., et al. (2004) Increased sensitivity of mannanemia detection tests by joint detection of alpha- and beta-linked oligomannosides during experimental and human systemic candidiasis. *J Clin Microbiol* **42**, 164-71
59. Jouault, T., et al. (2003) *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. *J Infect Dis* **188**, 165-72
60. Poulain, D., et al. (2002) Contribution of phospholipomannan to the surface expression of beta-1,2-oligomannosides in *Candida albicans* and its presence in cell wall extracts. *Infect Immun* **70**, 4323-8
61. Trinel, P. A., et al. (2002) *Candida albicans* phospholipomannan, a new member of the fungal mannanose inositol phosphoceramide family. *J Biol Chem* **277**, 37260-71
62. Jaafar, L., et al. (2003) Characterization of a disulphide-bound Pir-cell wall protein (Pir-CWP) of *Yarrowia lipolytica*. *Yeast* **20**, 417-26
63. Trinel, P. A., et al. (2002) Beta-1,2-mannosylation of *Candida albicans* mannoproteins and glycolipids differs with growth temperature and serotype. *Infect Immun* **70**, 5274-8
64. Nather, K., et al. (2008) Generating cell surface diversity in *Candida albicans* and other fungal pathogens. *FEMS Microbiol Lett* **285**, 137-45
65. Mora-Montes, H. M., et al. (2011) Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infect Immun* **79**, 1961-70
66. Netea, M. G., et al. (2008) An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol* **6**, 67-78
67. Murciano, C., et al. (2007) Both viable and killed *Candida albicans* cells induce in vitro production of TNF-alpha and IFN-gamma in murine cells through a TLR2-dependent signalling. *Eur Cytokine Netw* **18**, 38-43
68. Netea, M. G., et al. (2002) The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* **185**, 1483-9
69. Netea, M. G., et al. (2008) Role of TLR1 and TLR6 in the host defense against disseminated candidiasis. *FEMS Immunol Med Microbiol* **52**, 118-23
70. Coste, A., et al. (2008) IL-13 attenuates gastrointestinal candidiasis in normal and immunodeficient RAG-2(-/-) mice via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation. *J Immunol* **180**, 4939-47
71. Brown, G. D. (2006) Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol* **6**, 33-43
72. Galès, A., et al. (2010) PPARγ controls Dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog* **6**, e1000714
73. Sato, K., et al. (2006) Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem* **281**, 38854-66
74. Robinson, M. J., et al. (2009) Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med* **206**, 2037-51
75. Cambi, A., et al. (2008) Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan. *J Biol Chem* **283**, 20590-9

76. Jouault, T., et al. (2006) Specific recognition of *Candida albicans* by macrophages requires galectin-3 to discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and needs association with TLR2 for signaling. *J Immunol* **177**, 4679-87
77. Wells, C. A., et al. (2008) The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. *J Immunol* **180**, 7404-13
78. Han, K. H., et al. (2013) Immunological features of macrophages induced by various morphological structures of *Candida albicans*. *J Microbiol Biotechnol* **23**, 1031-40
79. Ermert, D., et al. (2013) *Candida albicans* escapes from mouse neutrophils. *J Leukoc Biol* **94**, 223-36
80. Vonk, A. G., et al. (2006) Endogenous interleukin (IL)-1 alpha and IL-1 beta are crucial for host defense against disseminated candidiasis. *J Infect Dis* **193**, 1419-26
81. Joly, S., et al. (2009) Cutting edge: *Candida albicans* hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome. *J Immunol* **183**, 3578-81
82. Eyerich, S., et al. (2011) IL-22 and TNF- $\alpha$  represent a key cytokine combination for epidermal integrity during infection with *Candida albicans*. *Eur J Immunol* **41**, 1894-901
83. d'Ostiani, C. F., et al. (2000) Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* **191**, 1661-74
84. van der Graaf, C. A., et al. (2005) Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by *Candida albicans* blastoconidia and hyphae. *Infect Immun* **73**, 7458-64
85. Cheng, S. C., et al. (2010) *Candida albicans* dampens host defense by downregulating IL-17 production. *J Immunol* **185**, 2450-7
86. Devillers, A., et al. (2013) Deficient beta-mannosylation of *Candida albicans* phospholipomannan affects the proinflammatory response in macrophages. *PLoS One* **8**, e84771
87. Poulain, D., et al. (2009) Yeasts: neglected pathogens. *Dig Dis* **27 Suppl 1**, 104-10
88. Ip, W. K., et al. (2004) Role of mannose-binding lectin in the innate defense against *Candida albicans*: enhancement of complement activation, but lack of opsonic function, in phagocytosis by human dendritic cells. *J Infect Dis* **190**, 632-40
89. Lillegard, J. B., et al. (2006) Recognition of *Candida albicans* by mannan-binding lectin in vitro and in vivo. *J Infect Dis* **193**, 1589-97
90. Babula, O., et al. (2003) Relation between recurrent vulvovaginal candidiasis, vaginal concentrations of mannose-binding lectin, and a mannose-binding lectin gene polymorphism in Latvian women. *Clin Infect Dis* **37**, 733-7
91. Ader, F., et al. (2011) Short term *Candida albicans* colonization reduces *Pseudomonas aeruginosa*-related lung injury and bacterial burden in a murine model. *Crit Care* **15**, R150
92. Müller, S., et al. (2010) Mannan-binding lectin deficiency results in unusual antibody production and excessive experimental colitis in response to mannose-expressing mild gut pathogens. *Gut* **59**, 1493-500
93. Takahashi, K., et al. (2002) Lack of mannose-binding lectin-A enhances survival in a mouse model of acute septic peritonitis. *Microbes Infect* **4**, 773-84
94. Thia, K. T., et al. (2010) Risk factors associated with progression to intestinal complications of Crohn's disease in a population-based cohort. *Gastroenterology* **139**, 1147-55
95. Antoni, L., et al. (2014) Intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **20**, 1165-79
96. Zeissig, S., et al. (2007) Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* **56**, 61-72
97. Di Sabatino, A., et al. (2003) Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum* **46**, 1498-507
98. Buisine, M. P., et al. (1999) Abnormalities in mucin gene expression in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* **5**, 24-32
99. Cadwell, K., et al. (2008) A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16l1 in mouse and human intestinal Paneth cells. *Nature* **456**, 259-63
100. Spehlmann, M. E., et al. (2008) Epidemiology of inflammatory bowel disease in a German twin cohort: results of a nationwide study. *Inflamm Bowel Dis* **14**, 968-76
101. Baumgart, D. C., et al. (2012) Crohn's disease. *Lancet* **380**, 1590-605
102. Franke, A., et al. (2010) Genome-wide meta-analysis increases to 71 the number of confirmed Crohn's disease susceptibility loci. *Nat Genet* **42**, 1118-25
103. Basu, D., et al. (2005) Impact of race and ethnicity on inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* **100**, 2254-61
104. Kaplan, G. G., et al. (2010) The inflammatory bowel diseases and ambient air pollution: a novel association. *Am J Gastroenterol* **105**, 2412-9
105. Monteleone, G., et al. (1999) Bioactive IL-18 expression is up-regulated in Crohn's disease. *J Immunol* **163**, 143-7
106. Kobayashi, T., et al. (2008) IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Gut* **57**, 1682-9
107. Hart, A. L., et al. (2005) Characteristics of intestinal dendritic cells in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **129**, 50-65
108. Hugot, J. P., et al. (2001) Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* **411**, 599-603
109. van Heel, D. A., et al. (2005) Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease. *Lancet* **365**, 1794-6
110. Cooney, R., et al. (2010) NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat Med* **16**, 90-7
111. Noguchi, E., et al. (2009) A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nat Immunol* **10**, 471-9
112. Barreau, F., et al. (2010) Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches. *Gut* **59**, 207-17
113. Watanabe, T., et al. (2004) NOD2 is a negative regulator of Toll-like receptor 2-mediated T helper type 1 responses. *Nat Immunol* **5**, 800-8
114. Schepp-Berglind, J., et al. (2012) Complement-dependent injury and protection in a murine model of acute dextran sulfate sodium-induced colitis. *J Immunol* **188**, 6309-18
115. Seibold, F., et al. (2007) Deficiency for mannan-binding lectin is associated with antibodies to

- Saccharomyces cerevisiae in patients with Crohn's disease and their relatives. *Gut* **56**, 152
116. Held, K., et al. (2008) Increased susceptibility of complement factor B/C2 double knockout mice and mannan-binding lectin knockout mice to systemic infection with *Candida albicans*. *Mol Immunol* **45**, 3934-41
  117. Coccia, M., et al. (2012) IL-1 $\beta$  mediates chronic intestinal inflammation by promoting the accumulation of IL-17A secreting innate lymphoid cells and CD4(+) Th17 cells. *J Exp Med* **209**, 1595-609
  118. Mudter, J., et al. (2007) Il-6 signaling in inflammatory bowel disease: pathophysiological role and clinical relevance. *Inflamm Bowel Dis* **13**, 1016-23
  119. Sprong, T., et al. (2004) Mannose binding lectin enhances IL-1 $\beta$  and IL-10 induction by non-lipopolysaccharide (LPS) components of *Neisseria meningitidis*. *Cytokine* **28**, 59-66
  120. Jack, D. L., et al. (2001) Mannose-binding lectin regulates the inflammatory response of human professional phagocytes to *Neisseria meningitidis* serogroup B. *J Infect Dis* **184**, 1152-62
  121. Zenaro, E., et al. (2009) Induction of Th1/Th17 immune response by *Mycobacterium tuberculosis*: role of dectin-1, Mannose Receptor, and DC-SIGN. *J Leukoc Biol* **86**, 1393-401
  122. Siakavellas, S. I., et al. (2012) Role of the IL-23/IL-17 axis in Crohn's disease. *Discov Med* **14**, 253-62
  123. Osorio, F., et al. (2008) DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers. *Eur J Immunol* **38**, 3274-81
  124. Burger, D., et al. (2011) Conventional medical management of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* **140**, 1827-1837.e2
  125. Hueber, W., et al. (2012) Secukinumab, a human anti-IL-17A monoclonal antibody, for moderate to severe Crohn's disease: unexpected results of a randomised, double-blind placebo-controlled trial. *Gut* **61**, 1693-700
  126. Colombel, J. F., et al. (2013) Secukinumab failure in Crohn's disease: the yeast connection? *Gut* **62**, 800-1



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
http://pharmacie.univ.lille2.fr/



DEMANDE D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Nom et Prénom de l'étudiant : CHOITEAU LAURA

Date, heure et lieu de soutenance :

Le 11/09/2015 à 14h00 Amphithéâtre ou salle : Salle Casino

Avis du conseiller (directeur) de thèse

Nom : SENRIO

Prénom : BONALCIN

[X] Favorable

[ ] Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 16.07.2015

Signature: [Signature]

Avis du Président de Jury

Nom : DELAUNAY

Prénom : Bertrand

[X] Favorable

[ ] Défavorable

Motif de l'avis défavorable :

Date : 19/08/2015

Signature: [Signature]

Décision de Monsieur le Doyen

[X] Favorable

[ ] Défavorable



NB : La faculté n'entend donner aucune approbation ou improbation aux opinions émises dans les thèses, qui doivent être regardées comme propres à leurs auteurs.

Université de Lille 2  
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE  
**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)  
Année Universitaire 2014/2015

Nom : CHOTEAU  
Prénom : LAURA

**Titre du mémoire / thèse : Le rôle de la Mannose Binding Lectin dans la régulation de l'inflammation intestinale et dans la colonisation digestive par *Candida albicans***

**Mots-clés : *Candida albicans*, Mannose Binding Lectin, Inflammation intestinale, Maladie de Crohn**

---

**Résumé : La Mannose Binding Lectin (MBL) est une lectine soluble du système immunitaire inné produite par le foie, capable de reconnaître différents pathogènes dont *Candida albicans*, de promouvoir leur phagocytose et de moduler la réponse inflammatoire. Notre objectif est d'étudier, à l'aide d'un modèle murin, l'expression gastro-intestinale de la MBL ainsi que son effet sur la modulation de l'inflammation intestinale et sur l'élimination de *C. albicans*. L'expression de MBL a été mise en évidence dans l'épithélium gastro-intestinal. Cette expression est augmentée lorsque les souris sont colonisées par *C. albicans* mais ne semble pas en lien avec les taux sériques. Les souris C57BL/6 sauvages traitées *per os* avec un ligand de la MBL et les souris déficientes en MBL sont plus intensément colonisées par *C. albicans* que les souris contrôles. De plus, une colite chimio-induite par DSS favorise la dissémination de *C. albicans* dans les reins et les poumons des souris MBL-KO. Ce déficit favorise l'expression des cytokines IL-17, IL-23 et celle des récepteurs Dectine-1 et TLR-4.**

**Cette étude confirme l'expression gastro-intestinale de la MBL chez la souris, en réponse à la détection de *C. albicans*. Cette expression est nécessaire à l'homéostasie intestinale et à la défense de l'hôte contre *C. albicans*.**

---

**Membres du jury :**

**Président :** Professeur DECAUDIN Bertrand, PU-PH,  
Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques, Lille.  
Pharmacie centrale, CHRU, Lille.

**Assesseur(s) :** Docteur MAZARS Edith, PH, CH Valenciennes  
Docteur TERRIER-LENGLET Aurélie, MCU-PH,  
UFR de pharmacie, Amiens. CHU, Amiens.

**Directeur de Thèse :** Professeur SENDID Boualem, PU-PH,  
Faculté de Médecine Henri-Warembourg, Lille.  
Laboratoire Parasitologie-Mycologie, CHRU, Lille  
Directeur Equipe 2/Inserm U995