

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine vétérinaire

Titre de la thèse en Français : Isolement et caractérisation d'une famille de gènes de *Microsporium canis* codant pour trois protéases de type subtilisine et contribution à l'étude de leur rôle dans la relation hôte-champignon

Titre de la thèse en Anglais : Isolation and characterization of a *Microsporium canis* gene family encoding three subtilisin-like serine proteases and contribution to the study of their role in the host-fungus relationship

Candidat : Frédéric Descamps

Promoteur : Dr Bernard Mignon

Co-promoteur : Prof. Bertrand Losson

Département et Service : Département des Maladies infectieuses et parasitaires, Service de Parasitologie et Pathologie des Maladies parasitaires, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

Date de la défense publique : 6 octobre 2003

Composition du Jury :

Membres internes à la Faculté de Médecine vétérinaire : F. Coignoul, C. Clerckx, L. Grobet, P. Gustin, B. Mignon, P. Lekeux, B. Losson, E. Thiry.

Membres externes à la Faculté de Médecine vétérinaire : J.-P. Bouchara (Université d'Angers), B. Nusgens (Université de Liège), J. Dommès (Université de Liège).

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

Les dermatophytoses, ou teignes, sont des mycoses contagieuses et superficielles fréquemment rencontrées en dermatologie humaine et vétérinaire. Elles sont provoquées par des champignons filamenteux kératinophiles et kératinolytiques, les dermatophytes. *Microsporium canis* est l'agent de dermatophytose le plus fréquent chez le chat, son hôte naturel, et chez le chien. L'incidence des infections humaines par *M. canis* est par ailleurs en augmentation (Lunder et Lunder, 1992). Les mécanismes physiopathologiques liés à l'infection des carnivores domestiques par *M. canis* demeurent largement inconnus. Néanmoins, ils dépendent de facteurs produits par le champignon ainsi que de la réaction de l'hôte envers celui-ci.

Etant donné le confinement quasi exclusif des dermatophytes pathogènes au sein des structures kératinisées de la peau et

de ses annexes, la sécrétion de protéases kératinolytiques (kératinases) par ces champignons a été considérée comme un élément pathophysiologique majeur. Ces protéases pourraient en effet intervenir dans la nutrition fongique (Ogawa et Tsuboi, 1997) et dans l'invasion des structures kératinisées par le champignon (Collins *et al.*, 1973). Plusieurs kératinases ont été isolées chez *M. canis*, dont une protéase à sérine de 31,5 kDa de type subtilisine (Mignon *et al.*, 1998a). Plusieurs éléments indiquent que cette kératinase pourrait constituer un facteur de virulence fongique important. Il s'agit en effet de la protéine sécrétée majoritairement par *M. canis* lorsque celui-ci est cultivé dans un milieu liquide minimal contenant de la kératine féline (Mignon *et al.*, 1998a). De plus, sa production a été mise en évidence *in vivo* chez le chat infecté naturellement (Mignon *et al.*, 1998a) et chez le cobaye infecté expérimentalement (Mignon *et al.*, 1999b). Néanmoins, cette protéase n'a pas été caractérisée au niveau génomique, ce qui constitue pourtant



une étape indispensable à la poursuite de l'étude de son rôle dans la pathogenèse des dermatophytoses à *M. canis*.

D'autre part, l'infection du chat par *M. canis* induit une réponse immunitaire spécifique (DeBoer *et al.*, 1991 ; DeBoer et Moriello, 1993 ; Sparkes *et al.*, 1993b ; Sparkes *et al.*, 1995 ; Sparkes *et al.*, 1996 ; Mignon *et al.*, 1999a ; Mignon *et al.*, 1999b) dont l'intensité a été mise en corrélation avec la guérison (Sparkes *et al.*, 1995) et avec la résistance envers une nouvelle infection (Sparkes *et al.*, 1996). Le développement d'un vaccin efficace destiné à lutter contre la dermatophytose à *M. canis* chez le chat semble donc *a priori* envisageable. Cependant, les quelques essais de vaccination réalisés à ce jour ne se sont avérés que peu ou pas concluants, et les vaccins utilisés n'étaient constitués que de souches fongiques, inactivées ou atténuées, ou d'antigènes bruts non caractérisés (DeBoer et Moriello, 1994b ; Elad et Segal, 1994 ; DeBoer et Moriello, 1995b ; DeBoer *et al.*, 2002). Dans ce contexte, la subtilase kératinolytique de 31,5 kDa constitue un candidat vaccinal intéressant. En effet, chez le cobaye infecté expérimentalement, cette protéase provoque l'induction d'une réponse immunitaire à médiation cellulaire (Mignon *et al.*, 1999b), réponse considérée comme primordiale pour l'élimination d'une dermatophytose et pour la protection contre une réinfection (Hay, 1997).

L'objectif général de ce travail est d'améliorer les connaissances relatives au rôle de la protéase kératinolytique de 31,5 kDa dans la virulence fongique et d'évaluer le pouvoir protecteur de la réponse immunitaire dirigée contre elle dans un modèle d'infection expérimentale.

RÉSULTATS

Afin de mieux caractériser la subtilase kératinolytique de 31,5 kDa (SUB3), et ultérieurement de construire un mutant de délétion, son gène a été isolé à partir d'une banque d'ADN génomique de *M. canis*. Le criblage de la banque

a permis le clonage de deux autres gènes codant pour des subtilases homologues, SUB1 et SUB2. L'analyse des séquences a révélé la présence, au sein des trois protéases SUB1, SUB2 et SUB3, des trois acides aminés (Aspartate-Histidine-Sérine) formant la triade catalytique caractéristique des protéases de la superfamille des subtilases. Des motifs conservés ont également été identifiés autour de chacun de ces acides aminés. En outre, les trois protéases présentent un pourcentage d'identité relativement élevé vis-à-vis des subtilases de *Trichophyton rubrum*, d'*Aspergillus fumigatus*, d'*Aspergillus oryzae*, d'*Aspergillus nidulans* et d'*Aspergillus flavus*. Les trois SUBs possèdent une séquence signal et une séquence proenzymatique.

Dans le but de vérifier la production de ces trois protéases *in vivo* pendant l'infection, des RT-PCR nichées ont été réalisées, au moyen d'amorces spécifiques de chaque gène, sur de l'ARN extrait de poils de cobayes infectés expérimentalement par *M. canis*. Cette étude a permis de démontrer que les trois gènes étaient transcrits *in vivo* lors de l'envahissement des structures kératinisées par le dermatophyte.

Dans le but de vérifier l'expression, par *M. canis*, des trois enzymes lors de l'infection d'hôtes spécifiques dans des conditions naturelles, des RT-PCR nichées ont été réalisées, avec les mêmes amorces spécifiques que dans l'étude précédente, sur de l'ARN extrait à partir de poils de quatre chats et d'un chien infectés naturellement. La transcription des trois gènes a également été évaluée au sein de cheveux et de squames, respectivement prélevés chez deux êtres humains infectés par *M. canis*.

La transcription des trois gènes a été mise en évidence chez deux des quatre chats infectés par *M. canis*, alors que la transcription de deux des trois gènes, respectivement SUB1 et SUB3, et SUB2 et SUB3 a été détectée chez les deux autres chats. Seul l'ARNm codant pour SUB1 a été mis en évidence à partir des prélèvements humains, tandis qu'aucun signal n'a été obtenu à partir de l'échantillon provenant du chien, qui avait par ailleurs reçu un traitement antifongique avant que les poils infectés ne soient prélevés.

Dans le but d'étudier de manière plus approfondie le rôle de SUB3 dans la virulence fongique ainsi que la réponse immunitaire dirigée contre elle, cette protéase a été exprimée sous forme recombinante à l'aide du système d'expression *Pichia pastoris*. La protéase recombinante (r-SUB3) a ensuite été purifiée à partir du surnageant de culture de la levure grâce à une étape de chromatographie par échange de cations. La subtilase recombinante présente une activité kératinolytique similaire à celle de la protéase native. A l'instar de SUB3, r-SUB3 n'est pas glycosylée.

Ensuite, les caractéristiques antigéniques de r-SUB3 ont été évaluées chez quatorze cobayes infectés expérimentalement. L'évolution du degré d'infection a été suivie au moyen d'un score global, calculé par l'addition de scores cliniques et mycologiques. Le score global maximal a été observé au jour 22 post infection (PI) et, deux mois après l'inoculation, tous les animaux étaient cliniquement guéris.

La cinétique de la réponse en anticorps a montré que, malgré une importante variation interindividuelle, l'infection expérimentale n'induisait pas la production d'anticorps spécifiques envers la protéase recombinante chez les cobayes, excepté chez un seul individu.

Par contre, les animaux infectés ont développé une réponse immune à médiation cellulaire dirigée contre r-SUB3, révélée par une réponse lymphoproliférative *in vitro* importante, significativement plus élevée au jour 43 PI qu'avant l'infection. Chez les animaux témoins non infectés, les réponses humorale et lymphoproliférative envers r-SUB3 sont restées à un niveau basal tout au long de l'expérience.

Outre SUB3, l'exoantigène brut de *M. canis*, à partir duquel la subtilase a été purifiée, induit également une réponse cellulaire chez le cobaye, d'une intensité très élevée (Mignon *et al.*, 1999b). La réponse à médiation cellulaire apparaissant primordiale pour la guérison ainsi que pour la protection ultérieure contre une dermatophytose, ces deux antigènes constituent des candidats vaccinaux potentiels.

Des cobayes ont donc été immunisés au moyen de la kératinase recombinante (r-SUB3) ou de l'exoantigène brut de *M. canis*, et ont ensuite été soumis à une épreuve d'infection expérimentale cutanée. L'évolution des lésions chez ces animaux a été comparée avec celle des lésions induites par une infection expérimentale chez des cobayes non vaccinés.

Les immunisations au moyen de r-SUB3 et de l'exoantigène brut ont induit la production d'anticorps spécifiques envers ces deux antigènes, dont les taux étaient significativement plus élevés que dans le groupe témoin non vacciné. L'induction d'une réponse lymphoproliférative importante dirigée contre les deux antigènes a été observée après la première immunisation. Par contre, l'intensité de cette réponse a par la suite nettement diminué et, au jour de l'épreuve d'inoculation, les index de stimulation étaient faibles, proches d'une valeur basale. L'infection expérimentale a quant à elle entraîné une augmentation, irrégulière, de la réponse cellulaire envers les deux antigènes, aussi bien chez les cobayes vaccinés que chez les animaux non vaccinés, et une réponse en anticorps dirigés contre l'exoantigène, mais pas contre la subtilase, chez les cobayes non vaccinés.

Malgré l'induction par la vaccination de réponses spécifiques humorale et cellulaire envers ces deux antigènes, aucune différence lésionnelle significative n'a été mise en évidence entre les groupes d'animaux vaccinés, d'une part, et le groupe d'animaux témoins non vaccinés, d'autre part. De même, la durée de la maladie n'a pas été significativement plus courte chez les animaux vaccinés.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Le but initial de ce travail était d'améliorer les connaissances relatives au rôle que joue la subtilase kératinolytique de 31,5 kDa de *Microsporum canis* dans la relation hôte-champignon. Cette kératinase pourrait être impliquée notamment dans la nutrition fongique et dans l'invasion des structures kératinisées par *M. canis*.

Dans un premier temps, son gène (*SUB3*) et deux autres gènes apparentés codant pour des protéases homologues (*SUB1* et *SUB2*) ont été isolés à partir d'une banque d'ADN génomique de *M. canis*. La transcription des trois gènes *SUBs* a été démontrée *in vivo*, chez des cobayes infectés expérimentalement par *M. canis*, ce qui suggère que les trois protéases correspondantes sont produites par le champignon lors de l'envahissement des structures kératinisées. L'isolement, chez *M. canis*, d'une famille de gènes codant pour trois subtilases exprimées *in vivo* suggère l'importance de ces enzymes dans le métabolisme du dermatophyte, voire dans sa virulence.

L'étude de l'expression des *SUBs* chez différents hôtes spécifiques de *M. canis* a révélé que, chez quatre chats infectés naturellement, au moins deux des trois gènes *SUBs* étaient transcrits, alors que chez deux êtres humains infectés testés, l'ARNm codant pour *SUB1* a été détecté. Ces résultats renforcent le bien-fondé de l'hypothèse selon laquelle ces subtilases sont impliquées dans la relation hôte-champignon.

Outre son rôle éventuel dans la virulence du champignon, la kératinase de 31,5 kDa constitue un candidat vaccinal intéressant, étant donné que l'infection expérimentale du cobaye induit une réponse immune à médiation cellulaire spécifiquement dirigée contre celle-ci. Pour pallier aux difficultés pratiques liées à la production de la protéase native, *SUB3* a été produite sous forme recombinante via le système d'expression en levure *Pichia pastoris*. La protéase recombinante, r-SUB3, présentant les mêmes caractéristiques biochimiques et antigéniques que la protéase native, a par conséquent été testée comme agent vaccinal lors d'un essai de vaccination contre la dermatophytose à *M. canis* chez le cobaye. L'exoantigène de *M. canis*, étant donné sa capacité

à induire une réponse cellulaire très intense chez le cobaye infecté expérimentalement, a également été testé. Malgré l'induction d'une réponse en anticorps significative et d'une réponse immune à médiation cellulaire relativement intense, dirigées à la fois contre r-SUB3 et l'exoantigène, aucun protocole de vaccination testé n'a permis de protéger les cobayes contre une épreuve d'infection expérimentale. L'intensité des symptômes et la durée de la maladie ont été similaires entre les groupes d'animaux vaccinés d'une part, et le groupe d'animaux non vaccinés d'autre part.

En conclusion, notre travail a permis d'améliorer les connaissances sur la relation hôte-champignon, d'une part, grâce à la caractérisation d'une famille de gènes codant pour des facteurs potentiels de virulence fongique, et d'autre part, via la réalisation d'études immunologiques vis-à-vis d'un membre de cette famille.

Afin de pouvoir définitivement confirmer, ou infirmer, l'implication des SUBs dans le processus de virulence fongique, la construction de mutants de délétion, ainsi que la comparaison de leur virulence vis-à-vis de celle d'une souche isogénique sauvage, s'avère indispensable. Par ailleurs, la caractérisation d'antigènes protecteurs est souhaitable au vu des caractères zoonosique et endémique de la dermatophytose à *M. canis*. D'autres essais de vaccination devraient donc être réalisés, en particulier chez le chat. D'autres antigènes présents dans l'exoantigène de *M. canis* pourraient s'avérer intéressants et devraient être caractérisés.

L'ensemble de ces travaux devrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques liés à l'infection par *M. canis* et également la mise au point de nouveaux outils thérapeutiques et/ou prophylactiques contre cette zoonose

REMERCIEMENTS

Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industriel et dans l'Agriculture (FRIA).

Fonds pour la Recherche scientifique et médicale (FRSM) 3.4534.01

Patrimoine de l'ULg

Fonds National Suisse de la Recherche Scientifique 3200-063697.0

RÉFÉRENCES

- COLLINS J. P., GRAPPEL S. F., BLANK F. Role of keratinases in dermatophytosis. II. Fluorescent antibody studies with keratinase II of *Trichophyton mentagrophytes*. *Dermatologica*, 1973, **146**, 95-100.
- DEBOER D. J., MORIELLO K. A. Humoral and cellular immune responses to *Microsporum canis* in naturally occurring feline dermatophytosis. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1993, **31**, 121-132.
- DEBOER D. J., MORIELLO K. A. The immune response to *Microsporum canis* induced by a fungal cell wall vaccine. *Vet. Dermatol.*, 1994, **5**, 47-55.
- DEBOER D. J., MORIELLO K. A. Investigations of a killed dermatophyte cell-wall vaccine against infection with *Microsporum canis* in cats. *Res. Vet. Sci.*, 1995, **59**, 110-113.
- DEBOER D. J., MORIELLO K. A., COOLEY A. J. Immunological reactivity to intradermal dermatophyte antigens in cats with dermatophytoses. *Vet. Dermatol.*, 1991, **2**, 59-67.
- DEBOER D. J., MORIELLO K. A., BLUM J. L., VOLK L. M., BREDAHL L. K. Safety and immunologic effects after inoculation of inactivated and combined live-inactivated dermatophytosis vaccines in cats. *Am. J. Vet. Res.*, 2002, **63**, 1532-1537.
- ELAD D., SEGAL E. Immunogenicity in guinea-pigs of a crude ribosomal fraction from *Microsporum canis*. *Vaccine*, 1994, **12**, 134-138.
- HAY R. J. Immunomodulation in superficial fungal infections. In: Jacobs P. H., Nall L. (Eds.), *Fungal disease. biology : immunology and diagnosis*. Marcel Dekker : New York, 1997, 209-218.

- LUNDER M., LUNDER M. Is *Microsporium canis* infection about to become a serious dermatological problem? *Dermatology*, 1992, **184**, 87-89.
- MIGNON B., SWINNEN M., BOUCHARA J. P., HOFINGER M., NIKKELSA., PIERARD G., GERDAY C., LOSSON B. Purification and characterization of a 31.5 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporium canis* and evidence of its secretion in naturally infected cats. *Med. Mycol.*, 1998, **36**, 395-404.
- MIGNON B.R., COIGNOUL F., LECLIPTEUX T., FOCANT C., LOSSON B. Histopathological pattern and humoral immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporium canis* in symptomatic and asymptomatic infected cats. *Med. Mycol.* 1999a, **37**, 1-9.
- MIGNON B.R., LECLIPTEUX T., FOCANT C., NIKKELS A. J., PIERARD G. E., LOSSON B.J. Humoral and cellular immune response to a crude exo-antigen and purified keratinase of *Microsporium canis* in experimentally infected guinea pigs. *Med. Mycol.*, 1999b, **37**, 123-129.
- OGAWA H., TSUBOI R. Fungal enzymes related to the pathogenesis of mycoses. In: Jacobs P. H., Nall L. (Eds.), *Fungal disease : biology, immunology and diagnosis*. Marcel Dekker : New York, 1997, 191-207.
- SPARKES A.H., STOKES C.R., GRUFFYDD-JONES T.J. Humoral immuneresponses incats with dermatophytosis. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 1869-1873.
- SPARKES A.H., STOKES C.R., GRUFFYDD-JONES T.J. Experimental *Microsporium canis* infection in cats: correlation between immunological and clinical observations. *J. Med. Vet. Mycol.*, 1995, **33**, 177-184.
- SPARKES A.H., STOKES C.R., GRUFFYDD-JONES T.J. Acquired immunity in experimental feline *Microsporium canis* infection. *Res. Vet. Sci.*, 1996, **61**, 165-168.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- DESCAMPS F., BROUTA F., LOSSON B., MIGNON B. Perspectives de vaccination anti-dermatophytique chez les carnivores domestiques. *Ann. Méd. Vét.*, 2001, **145**, 178-182.
- DESCAMPS F., BROUTA F., MONOD M., ZAUGG C., BAAR D., LOSSON B., MIGNON B. Isolation of a *Microsporium canis* gene family encoding three subtilisin-like proteases expressed *in vivo*. *J. Invest. Dermatol.*, 2002, **119**, 830-835.
- DESCAMPS F., BROUTA F., VERMOUT S., MONOD M., LOSSON B., MIGNON B. Recombinant expression and antigenic properties of a 31.5 kDa keratinolytic subtilisin-like serine protease from *Microsporium canis*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 2003, **38**, 29-34.
- DESCAMPS F., BROUTA F., VERMOUT S., WILLAME C., LOSSON B., MIGNON B. A recombinant 31.5 kDa keratinase and a crude exo-antigen from *Microsporium canis* fail to protect against a homologous infection in guinea pigs. *Vet. Dermatol.*, 2003, **14**, 305-312.