



**HAL**  
open science

# ETUDE DES SIGNAUX MACROPHAGIQUES CELLULAIRES EN RÉPONSE À L'INFECTION PAR DIFFÉRENTES SOUCHES CLINIQUES DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS

Aude Surny-Leclère

► **To cite this version:**

Aude Surny-Leclère. ETUDE DES SIGNAUX MACROPHAGIQUES CELLULAIRES EN RÉPONSE À L'INFECTION PAR DIFFÉRENTES SOUCHES CLINIQUES DE CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS. *Biologie cellulaire*. 2012. hal-01472831

**HAL Id: hal-01472831**

**<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01472831>**

Submitted on 21 Feb 2017

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

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

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

**Sciences de la Vie et de la Terre**

**MÉMOIRE**

présenté par

**Sturny Leclère Aude**

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

**ETUDE DES SIGNAUX MACROPHAGIQUES CELLULAIRES EN  
RÉPONSE À L'INFECTION PAR DIFFÉRENTES SOUCHES  
CLINIQUES DE *CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS***

Soutenu le 21 Juin 2012

Devant le jury suivant

Dr. Canque Bruno : Président  
Dr. El Hachimi Khalid : Tuteur pédagogique  
Pr. Dromer Françoise : Tuteur scientifique  
Dr. Gougeon Marie-Lise : Rapporteur  
Dr. Chignard Michel : Examineur  
Vernel-Pauillac Frédérique : Examineur

Mémoire préparé sous la direction de :

Pr. DROMER Françoise (francoise.dromer@pasteur.fr)  
Unité de Mycologie Moléculaire CNRS URA 3012  
Institut Pasteur - 25-28 rue du Docteur Roux - 75724 Paris Cedex 15  
Et de

Dr. EL HACHIMI Khalid (khalid.el\_hachimi@upmc.fr)  
Centre de recherche de l'Institut du cerveau et de la moelle épinière  
CHU Pitié Salpêtrière - 47, bd de l'hôpital - 75651 Paris Cedex 13

**ETUDE DES SIGNAUX MACROPHAGIQUES CELLULAIRES EN RÉPONSE À  
L'INFECTION PAR DIFFÉRENTES SOUCHES CLINIQUES DE  
*CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS***

Sturny Leclère Aude

# RÉSUMÉ

*Cryptococcus neoformans* est une levure capsulée responsable d'infections opportunistes chez les patients présentant un déficit immunitaire et plus particulièrement chez ceux atteints du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). La forme la plus grave de la cryptococcose est une méningo-encéphalite qui reste mortelle dans 20% des cas malgré un traitement antifongique adapté. La contamination donne lieu à une primo-infection pulmonaire. Les macrophages alvéolaires sont la première cible du pathogène et vont déclencher la réponse innée. Le réseau cytokinique joue un rôle majeur dans l'orchestration d'une réponse immunitaire efficace. Actuellement, de nombreuses données sont disponibles sur la virulence de *C. neoformans*. En revanche, la réponse des macrophages à l'infection par la levure reste encore à approfondir. Les données publiées sur cette réponse immunitaire sont très variables selon le protocole expérimental.

Nos objectifs étaient d'étudier la réponse cellulaire des macrophages après interaction avec des souches cliniques issues de patients atteints de cryptococcose.

Après optimisation d'un protocole d'interaction macrophages/levures, nous avons étudié avec un panel de souches cliniques possédant des caractères de virulence différents, l'expression quantitative des signaux macrophagiques (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-1 $\beta$ , Mannose récepteur, TLR4, iNOS) par la technique de PCR en temps réel.

Au travers de la diversité de ces souches cliniques, nous avons observé la diversité de la réponse de l'hôte, des messagers immunitaires étaient spécifiquement dérégulés selon les souches.

Plusieurs messagers clés de la réponse inflammatoire sont encore en cours d'étude. Après analyse quantitative des résultats préliminaires, nous essayerons de déterminer si l'un de ces messagers possède le potentiel de « marqueur de pronostic » nous permettant de suivre l'évolution de l'infection et ainsi d'appréhender les cas les plus sévères de cette maladie.

**MOTS-CLÉS :** *Cryptococcus neoformans*, macrophage, cytokines, PCR temps réel, expression quantitative

<b>RESUME</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>4</b>
I. CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS : LE CHAMPIGNON.....	5
I.1. Généralités.....	5
I.2. Répartition géographique et habitats.....	5
I.3. Facteurs de virulence.....	6
II. LA CRYPTOCOCCOSE .....	7
II.1. Epidémiologie.....	7
II.2. Clinique/Pronostic.....	8
II.3. Physiopathologie.....	9
III. LA REPONSE IMMUNITAIRE.....	10
III.1. Immunité innée .....	10
III.2. Immunité adaptative.....	14
III.2.A. Réponse immunitaire à médiation cellulaire.....	14
III.2.B. Réponse immunitaire à médiation humorale.....	15
III.2.C. Les cytokiniques et les chimiokines.....	16
IV. REPONSE IMMUNITAIRE A L'INFECTION PAR <i>C. NEOFORMANS</i> .....	17
IV.1. La réponse immunitaire innée.....	18
IV.2. La réponse immunitaire adaptatrice.....	20
V. OUTILS D'ETUDES .....	21
V.1. Les modèles d'études de la réponse immunitaire.....	21
V.2. Etude de l'expression par PCR en temps réel.....	25
VI. PROBLEMATIQUE ETUDIEE ET OBJECTIFS .....	
<b>MATERIEL</b> .....	
<b>&amp; METHODES</b> .....	
I. SOUCHES DE <i>C. NEOFORMANS</i> .....	
I.1. Origine.....	
I.2. Repiquage, stockage.....	
I.3. Préculture et préparation des levures avant contact avec les macrophages .....	
II. Matériel et culture cellulaire.....	
II.1. Source.....	
II.2. Entretien.....	
II.3. Préparation avant contact avec les levures .....	
III. MODELE D'INTERACTION MACROPHAGES/ <i>C. NEOFORMANS</i> .....	
III.1. Anticorps monoclonal IgG1 E1.....	
III.2. Interaction macrophages/ <i>C. neoformans</i> .....	
III.3. Optimisation du modèle .....	
IV. PREPARATION DES ARN .....	
IV.1. Protocole d'extraction d'ARN.....	
IV.2. Traitement DNase .....	
IV.3. Synthèse de cDNA .....	
V. PCR QUANTITATIVE.....	
V.1. Light Cycler 480 II Roche.....	
V.2. Dessin des amorces.....	
V.3. Protocole d'amplification par PCR .....	
V.4. Mise au point du protocole de qPCR .....	
V.5. Critères d'analyse des données générées par qPCR.....	
V.6. Électrophorèse.....	
V.7. Mise au point des courbes standards de référence.....	
V.8. Détails de la méthode de calcul de quantification relative par le $\Delta\Delta t$ .....	
<b>RESULTATS</b> .....	
I. OPTIMISATION DU MODELE CELLULAIRE EXPERIMENTAL .....	

II. OPTIMISATION DES PROTOCOLES DE QUANTIFICATION DE L'EXPRESSION.....	
II.1 Mise au point et validation du protocole d'extraction d'ARN .....	
II.2. Intérêt du traitement à la DNase..II.3 Mise au point et validation du protocole de synthèse de ADNcII.4. Mise au point du protocole de PCR, validation des couples d'amorces et validation des critères d'analyse : <i>Exemple pour le gène de la <math>\beta</math>-Actine</i> .....	
II.5. Validation des courbes standard de référence pour tous les gènes cibles : <i>Exemple pour le gène de l'IL-6</i> .....	
II.6. Démarche de reproductibilité des courbes standard.....	
III. ANALYSE D'EXPRESSION DES GENES .....	
III.1. Validation de la méthode de quantification et du système.....	
III.2. Résultats du niveau d'expression des gènes sur une cinétique précoce.....	
III.3. Résultats d'expression des gènes liées aux conditions d'opsonisation .....	
par E1.....	
<b>DISCUSSION .....</b>	
<b>&amp; PERSPECTIVES.....</b>	
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	
<b>ANNEXES.....</b>	
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>32</b>

MOTS-CLÉS : *Cryptococcus neoformans*, macrophage, cytokines, PCR temps réel, expression quantitative

### LISTE DES ABRÉVIATIONS :

*Cryptococcus neoformans* : *C. neoformans*  
Glucuronoxylomannane : GXM  
Galactoxylomannane : GalXM  
Uréase : URE1  
Phospholipase : PLB1  
Hyaluronidase : CPS1  
Syndrome d'immunodéficience acquise : SIDA  
Virus de l'immunodéficience féline : FIV  
Liquide céphalo-rachidien : LCR  
Barrière hémato-encéphalique : BHE  
Macrophage Mannose Receptor : MMR  
Cellules Natural Killer : NK  
Cellules présentatrices d'antigène : CPA  
Lymphocytes B : L<sub>B</sub>  
Lymphocytes T : L<sub>T</sub>  
Lymphocytes T auxiliaires ou « helper » : L<sub>T</sub>CD4+  
Interférons : IFN  
Interleukines : IL-  
Facteur de nécrose tumorale : TNF  
Facteurs de croissance de transformation : TGF  
Immunoglobuline : Ig  
Cellules mononuclées de sang humain : PBMC  
Macrophages alvéolaires : PAM  
Polynucléaires neutrophiles humains : PMN  
Polymerase Chain Reaction : PCR  
PCR quantitative : qPCR  
Acide Désoxyribonucléique : ADN  
Acide RiboNucléique : ARN  
ADNc : ADN complémentaire  
Machine de PCR en temps Réel Light Cycler Roche LC 480 II : LC 480  
Point de fusion : T<sub>m</sub>  
Cycle Threshold : Ct  
Macrophages murins J774.16 : J 774  
American Type Culture Collection : ATCC  
Phosphate Buffer Salin : PBS  
Anticorps monoclonal IgG1 E1 : E1  
Dulbecco Modified Eagle Medium + 10%SVF + 1% P/S : DMEM complet  
Sérum de Veau Fœtal : SVF  
Pénicilline/Streptomycine : P/S  
Boîtes de culture cellulaire de 10cm<sup>2</sup> : B10  
Chlorure de Magnésium : MgCl<sub>2</sub>  
Bromure d'éthidium : BET  
DéoxyriboNucléotides-TriPhosphate dNTP : dATP, dTTP, dGTP et dCTP  
Tris Acétate EDTA : TAE  
Relative Quantification : RQ  
Lipopolysaccharide : LPS

Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase : GAPDH

## UNITÉS DE MESURE :

Paire de Bases : pb  
Micromètre :  $\mu\text{m}$   
Micromolaire :  $\mu\text{M}$   
Millimolaire :  $\mu\text{M}$   
Microlitre :  $\mu\text{l}$   
Nanogramme : ng  
Fentogramme : fg  
Attogramme : ag

## Liste des figures et tableaux :

Figure 1 : Levure *C. neoformans* observée après coloration à l'encre de chine, mettant en évidence la capsule polysaccharidique.

Figure 2 : Marquage de la capsule de *C. neoformans* par un anticorps monoclonal (E1) spécifique du GXM (vert). Les levures du sérotype A sont marquées de façon homogène et forment des agrégats visibles au microscope à épifluorescence après incubation avec un conjugué fluorescent (X 40).

Figure 3 : Evolution du nombre de cas de cryptococcose déclarés au CNRMA depuis 1985 (Bilan au 19/02/2012) (Rapport d'activité 2011).

Figure 4 : Cycle d'infection de *C. neoformans* (Environnement et hôtes) (Lin X. & J. Heitman J., 2006).

Figure 5 : Mise place des barrières de défense naturelles.

Figure 6 : Mise en place de la réaction inflammatoire.

Figure 7 : Les 4 étapes du processus de phagocytose : attraction, adhérence, début et fin de la digestion de la bactérie ([http://leucemie.therapie.free.fr/html/sys\\_immun/sys\\_immun3.htm](http://leucemie.therapie.free.fr/html/sys_immun/sys_immun3.htm)).

Figure 8 : Cascade protéolytique d'activation du système du complément (Peffault de Latour R., *et al.* 2009).

Figure 9 : Mise en place de la réponse immunitaire spécifique ([http://cdn.medicopedia.net/Schemas/Reaction\\_immunitaire.gif](http://cdn.medicopedia.net/Schemas/Reaction_immunitaire.gif)).

Figure 10 : Courbes de fusion de plusieurs échantillons amplifiés.

Figure 11 : Représentation graphique des cycles d'amplification (Ligne orange = bruit de fond ; Flèche rouge = quantité indétectable d'ADN ; Annotations violettes = phase exponentielle ; Flèche verte = phase de plateau).

Figure 12 : Schématisation de la courbe standard à partir des données des courbes d'amplification.

Figure 13 : Cellules J774.16 en culture.

Image 14 : Schématisation du modèle d'interaction entre les macrophages J774 et *C. neoformans*.

Figure 15 : Light Cyler II 480, Roche.

Figure 16 : Pics d'amplification des tm et visualisation des courbes d'amplification des Ct des dilutions de la gamme de référence du gène GAPDH.

Figure 17 : Détails de la matrice de calcul pour la méthode de quantification par la méthode relative du  $\Delta\Delta\text{dt}$  (M.W. Pfaffl 2001).

Figure 18 (Obj. x40) : Observation microscopique de l'interaction entre les macrophages J774 et *C. neoformans* après 2H de contact pour des ratios de 1/5 et 1/10.

Figure 19 : Morphologie des macrophages J774 à différents temps post-infection. Cellules témoins non infectées (NI), infectées par *C. neoformans* souche de référence (H99) et par deux souches cliniques (AD1-07a et AD2-60a).

Figure 20 : Observation des macrophages J774 à différents temps post-infection. Cellules témoins non infectées (NI), infectées par *C. neoformans* souche de référence H99 et par deux souches cliniques AD1-07a et AD1-83a.

Figure 21 : Observation des macrophages J774 2H et 6H post-infection. Cellules témoins non infectées (NI), infectées par *C. neoformans* souche de référence H99 et par deux souches cliniques 1AD-07a et AD1-83a. En présence de E1 (+ E1) ou en absence de E1 (-E1).

Figure 22 : Observation des macrophages J774 24H et 32H post-infection. Cellules témoins non infectées (NI), infectées par *C. neoformans* souche de référence H99 et par deux souches cliniques AD1-07a et AD1-83a. En présence de E1 (+ E1) ou en absence de E1 (-E1).

Figure 23 : Observation des macrophages J774 48H post-infection. Cellules témoins non infectées (NI), infectées par *C. neoformans* souche de référence H99 et par deux souches cliniques AD1-07a et AD1-83a. En présence de E1 (+ E1) ou en absence de E1 (-E1).

Figure 24 : Courbes de fusion générées par l'amplification du fragment de la  $\beta$ -Actine.

Figure 25 : Courbes d'amplifications spécifiques du fragment de la  $\beta$ -Actine générée par deux concentrations d'amorce 0,5 $\mu$ M et 0,3 $\mu$ M.

Figure 26 : Dépôts sur gel d'agarose à 1,5% des deux amplifications du fragment de la  $\beta$ -Actine.

Figure 27 : Etape de validation de la courbe standard de référence du gène de l'IL-6.

Figure 28 : Niveau d'expression du TNF- $\alpha$  dans les macrophages après interaction avec le LPS et la souche H99 de *C. neoformans*.

Figure 29 : Niveau d'expression de IL-1 $\beta$  dans les macrophages après interaction avec le LPS et la souche H99 de *C. neoformans*.

Figure 30 : Niveau d'expression de IL-6 dans les macrophages après interaction avec le LPS et la souche H99 de *C. neoformans*.

Figure 31 : Niveau d'expression de IL-10 dans les macrophages après interaction avec le LPS et la souche H99 de *C. neoformans*.

Figure 32 : Niveau d'expression du TNF- $\alpha$  dans des macrophages J774 infectés par 3 souches cliniques (AD1-07a, AD1-83a et AD2-60a) de *C. neoformans* sur une cinétique de 2 à 10H.

Figure 33 : Niveau d'expression du TNF- $\alpha$  par les cellules J774 après interaction avec les 9 souches cliniques de *C. neoformans* sur une cinétique de 2 à 10H, mesuré par qPCR.

Figure 34 : Niveau d'expression de l'IL-6 dans des macrophages J774 infectés par 3 souches cliniques (AD1-07a, AD1-83a et AD2-60a) de *C. neoformans* sur une cinétique de 2 à 10H.

Figure 35 : Niveau d'expression du TLR4 dans des macrophages J774 infectés par 3 souches cliniques (AD1-07a, AD1-83a et AD2-60a) de *C. neoformans* sur une cinétique de 2 à 10H.

Figure 36 : Niveau d'expression du TNF- $\alpha$  dans des macrophages J774 infectés par deux souches cliniques (AD1-07a et AD1-83a) de *C. neoformans* en présence ou en absence de E1.

Figure 37 : Niveau d'expression de l'IL-6 dans des macrophages J774 infectés par deux souches cliniques (AD1-07a et AD1-83a) de *C. neoformans* en présence ou en absence de E1.

Figure 38 : Niveau d'expression du TLR4 dans des macrophages J774 infectés par deux souches cliniques (AD1-07a et AD1-83a) de *C. neoformans* en présence ou en absence de E1.

Tableau 1 : Séquences des amorces sens et anti-sens spécifiques des fragments des gènes sélectionnés dans notre étude.

Tableau 2 : Composition du milieu réactionnel pour la réaction de qPCR.

Tableau 3 : Optimisation du modèle d'interaction

Tableau 4 : Moyenne de résultats obtenus avec les 2 protocoles d'extractions d'ARNs testés.

Tableau 5 : Résultats des amplifications par PCR en temps réel des d'ARN (75 ng) traités ou non à la DNase.

Tableau 6 : Résultats des synthèses d'ADNc réalisées à partir d'1 $\mu$ g quantité d'ARNs/DNase +.

Tableau 7 : Résultats des valeurs d'amplification par PCR selon les protocoles utilisés.

Tableau 8 : Résultats des extractions sur gel d'agarose et conversions des concentrations en nombre de cop/ $\mu$ l.

Tableau 9 : Résultats des critères de validation de toutes les courbes standard générées.



# INTRODUCTION

*Cryptococcus neoformans* a été identifié pour la première fois en 1894 suite à un examen microscopique réalisé à partir d'un isolat chirurgical issue d'une lésion de sarcome d'un tibia chez une femme de 31 ans (Casadevall, A. *et al.* 1998).

Au début du XXe siècle, plusieurs isolements de ce même microorganisme ont suivi sur des origines diverses. C'est en 1950 que cet agent est admis comme étant responsable de la cryptococcose. La cryptococcose est une infection fongique opportuniste pulmonaire, cutanée ou cérébrale (Casadevall, A. *et al.* 1998; Kwon-Chung, K.J. *et al.* 2012). Après plusieurs études taxonomiques, ce champignon sera finalement désigné « *Cryptococcus neoformans* ».

## I. *Cryptococcus neoformans* : le champignon

### I.1. Généralités

*Cryptococcus neoformans* est une levure ubiquitaire de l'environnement responsable de la cryptococcose, une maladie infectieuse mortelle en absence de traitement, diagnostiquée essentiellement chez les patients en déficit immunitaire.

Cette levure de forme ronde ou ovale, mesure entre 5 et 10µm de diamètre. L'originalité de *C. neoformans* est la présence d'une capsule polyosidique, qui représente son principal facteur de virulence(Casadevall, A. *et al.* 1998).

L'espèce *C. neoformans* est associée à deux sérotypes, sérotype A correspondant à la variété *grubii* et D, correspondant à la variété *neoformans*. Une deuxième espèce, l'espèce *gattii* est décrite au sein du genre *Cryptococcus*, associée aux sérotypes B et C.

Chez l'homme il a été démontré que le sérotype A provoque des infections plus sévères que le sérotype D (Dromer, F. *et al.* 2007).

### I.2. Répartition géographique et habitats

La répartition géographique de *C. neoformans* est différente selon la variété. Le sérotype A, variété *grubii*, responsable de la majorité des cas de cryptococcose est cosmopolite, tandis que le sérotype D, variété *neoformans*, est présent en Europe et particulièrement en France (responsable de 21% des cryptococcose en France) (Dromer, F. *et al.* 1996; Desnos-Ollivier, M. *et al.* 2010).

L'espèce *gattii* a longtemps été cantonnée aux individus vivant ou ayant voyagés dans des zones géographiques tropicales et subtropicales, comme l'Afrique et en Asie du sud-est (Kidd, S.E. *et al.*

2007). Récemment cette variété a gagné une distribution mondiale. En effet, elle s'est manifestée au Canada, sur l'île de Vancouver et en Colombie Britannique (Stephen, C. *et al.* 2002). Elle est responsable d'infections non seulement chez les patients immunodéprimés, mais également chez des individus immunocompétents et est considérée comme un problème de santé publique local (Datta, K. *et al.* 2009).

Les réservoirs principaux de *C. neoformans* sont les sols, les débris végétaux (forêts et clairières), les agrumes et les fientes d'oiseaux (pigeon ; canaris) (Casadevall, A. *et al.* 1998; Randhawa, H.S. *et al.* 2008).

### I.3. Facteurs de virulence

*C. neoformans* possède de nombreux facteurs de virulence, parmi lesquels la capsule polyosidique, la mélanine, la capacité de croître à 37°C et différentes enzymes secrétées qui lui donnent les facultés de modifier et de manipuler les mécanismes de défense de l'hôte qu'il envahit.

La capsule polyosidique représente le facteur majeur de virulence de *C. neoformans* mais aussi le caractère le plus étudié à ce jour. En effet, les souches acapsulées ne sont pas virulentes et les mutants de capsule montrent des virulences variables (Bose, I. *et al.* 2003).

Cette enveloppe osidique recouvre la totalité de la paroi de la levure. Elle est visible en microscopie optique après coloration à l'encre de Chine (Figure 1). Elle est de taille variable selon son environnement nutritif (sols, cerveau, poumons, divers liquides biologiques) (Rivera, J. *et al.* 1998). La capsule est composée en majorité de deux sucres : le glucuronoxylomannane (GXM) et de galactoxylomannane (GalXM) (représentant respectivement 88% et 10% de la capsule) et d'une faible proportion de mannoprotéines (Bose, I. *et al.* 2003).

Le GXM est un polymère constitué d'une chaîne linéaire de  $\alpha(1,3)$ -mannose sur laquelle se branchent des motifs  $\beta(1,2)$  acide glucuronique, des dérivés O-acétyl et xylose (McFadden, D. *et al.* 2006). Ce polymère forme une structure large et complexe de poids moléculaire élevé. Il est sécrété au cours de l'infection et ses propriétés osmotiques seraient responsables de l'œdème cérébral et de l'hypertension intracrânienne chez les malades au stade de la méningo-encéphalite (Chretien, F. *et al.* 2002).

La structure capsulaire confère des propriétés antigéniques à *C. neoformans* ce qui a longtemps permis de faire le sérotypage des souches à l'aide d'immuns sérums ou d'anticorps monoclonaux (Dromer, F. *et al.* 1993).

En plus de cette particularité capsulaire, *C. neoformans* possède d'autres caractères de virulence, comme la production de mélanine. Ce pigment possède des propriétés anti-oxydantes qui procurent à la levure une protection contre les rayonnements ultra-violet de l'environnement (Casadevall, A. *et al.* 1998).

Les espèces fongiques sont très nombreuses dans l'environnement. Moins de 0,01% sont identifiées comme pathogènes pour l'homme. La majorité de ces champignons ne sont pas capables de survivre ni même de se multiplier à 37°C. Mais *C. neoformans* possède cette propriété de se développer à la température physiologique des mammifères. Cette particularité lui donne un facteur de virulence supplémentaire (Odom, A. *et al.* 1997; Steenbergen, J.N. *et al.* 2003).

Les enzymes comme l'uréase (URE1), la phospholipase (PLB1) et la hyaluronidase (CPS1) ont été identifiées comme étant d'autres facteurs de virulence.

## II. La Cryptococcose

La cryptococcose est une infection qui fait l'objet, en France, d'une surveillance épidémiologique nationale menée par le Centre National de Référence Mycoses Invasives et Antifongiques, hébergé dans l'Unité de Mycologie Moléculaire.

### II.1. Epidémiologie

La cryptococcose est une maladie infectieuse identifiée en grande majorité chez des patients présentant un déficit immunitaire et plus particulièrement chez ceux atteints par le SIDA. Cette infection opportuniste reste rare pendant la première partie du XXe siècle. C'est dans les années 1980, qu'on observe une augmentation importante des cas de cryptococcose. Cette recrudescence survient en parallèle de l'émergence du virus du SIDA.

L'introduction des multi-thérapies anti-rétrovirales en 1996 a considérablement diminué la fréquence de la maladie dans les pays ayant accès à ce type de traitement (Dromer, F. *et al.* 2003). Mais cette pathologie reste un problème de santé publique majeur dans plusieurs pays d'Afrique et en Asie du sud-est où elle concerne près d'un million de patients chaque année et est associée à une mortalité globale supérieure à 50% (Park, B.J. *et al.* 2009). La cryptococcose est la première cause de méningite chez l'adulte en Afrique du Sud et la deuxième infection opportuniste après la tuberculose. En France, malgré le traitement adapté la mortalité reste de l'ordre de 18%.

Cette infection se déclare donc dans la majorité des cas chez les patients atteints du syndrome d'immunodéficience acquise (VIH) (Casadevall, A. *et al.* 1998). Mais également chez les patients atteints de maladies lymphoïdes chroniques comme le lymphome, chez les transplantés d'organes, chez les personnes diabétiques ou encore chez les patients ayant subi un traitement de longue durée aux corticoïdes.

La cryptococcose est une maladie essentiellement humaine mais elle touche d'autres mammifères. Elle se traduit aussi en méningite ou en pneumopathie chez le cheval et provoque de sévères mammites chez les bovins et les ovins (Riley, C.B. *et al.* 1992).

Le chat est un animal largement exposé à la cryptococcose surtout quand il est infecté par le FIV (virus de l'immunodéficience féline) (Malik, R. *et al.* 1997).

Aucune transmission directe de l'animal à l'homme ou d'homme à homme n'a été mise en évidence.

## II.2. Clinique/Pronostic

La cryptococcose est généralement diagnostiquée à un stade avancé de la maladie SIDA et dans la majorité des cas de façon fortuite. La forme clinique la plus fréquente de la cryptococcose est une méningo-encéphalite disséminée. Les symptômes cliniques sont variables et non spécifiques : céphalées, altération de la conscience et fièvre modérée dans la majorité des cas, mais aussi des vertiges, irritabilité, crises convulsives et déficit moteur peuvent apparaître. Quand l'infection est localisée au niveau pulmonaire, la cryptococcose se manifeste de façon non spécifique : toux, douleur thoracique et fièvre.

Le diagnostic s'appuie sur la mise en évidence de la levure dans le prélèvement du liquide céphalo-rachidien (LCR) ou dans d'autres échantillons biologiques. En parallèle, des dosages de GXM dans le sérum et le LCR sont effectués afin de déterminer le titre. L'association de deux antifongiques, l'Amphotéricine-B et la Flucytosine est prescrite dans les cas les plus sévères pour de 2 semaines de traitement. Ce traitement est relayé jusqu'à 3 mois par le Fluconazole (Dromer, F. *et al.* 2007).

En absence de traitement antifongique adapté, la cryptococcose méningée est mortelle dans 100% des cas.

A ce jour, aucun marqueur spécifique de la sévérité au cours de la cryptococcose n'a été identifié. Trouver un bio marqueur est une nécessité pour améliorer le pronostic. Des marqueurs immunologiques de l'hôte ou des marqueurs issus de la multiplication de *C. neoformans* dosables dans des prélèvements biologiques au cours de la dissémination pourraient être utile à la meilleure prise en charge des patients.

### II.3. Physiopathologie

Du fait de l'omniprésence de *C. neoformans* dans l'environnement la population est très largement exposée à ce pathogène. La découverte d'anticorps spécifiques dans le sérum de la majorité d'individus n'ayant pas déclaré de cryptococcose le démontre (Dromer, F. *et al.* 1988; Chen, L.C. *et al.* 1999). De plus, cette contamination survient dès l'enfance (Goldman, D.L. *et al.* 2001).

La contamination se ferait essentiellement par les voies pulmonaires par l'inhalation de particules infectantes présentes dans l'environnement. Elles s'introduisent directement dans les alvéoles des poumons pour être phagocytées rapidement par la première ligne de défense immunitaire locale : les macrophages alvéolaires. Ce contact est la primo-infection pulmonaire. Dans la majorité des cas, elle est asymptomatique grâce à une réaction immunitaire locale aboutissant à neutraliser *C. neoformans*. Mais cette neutralisation est partiellement efficace, car au travers de mécanismes encore inconnus *C. neoformans* va être capable de détourner le système immunitaire de l'hôte pour s'installer définitivement en état de dormance (Garcia-Hermoso, D. *et al.* 1999). Des levures dormantes sont capables de persister probablement dans les macrophages alvéolaires et il n'est pas exclu que *C. neoformans* ait trouvé d'autres sanctuaires au sein de l'organisme. Chez l'homme, on peut noter que la prostate a été identifiée comme site d'infection latent suite à une cryptococcose traitée (Ndimbie, O.K. *et al.* 1994). Cet état est dit de « latence » car la durée est dépendante de l'état immunitaire de l'individu. Dans la majorité des cas, aucune réactivation de la levure ne sera observée, mais en cas de diminution des défenses immunitaires, particulièrement des cellules T CD4+ chez les individus atteints du SIDA, l'infection va se réactiver. Grâce à une stratégie non élucidée, *C. neoformans* va être capable de rentrer à nouveau en division pour disséminer dans tout l'organisme. Les levures libres ou internalisées dans les cellules phagocytaires entrent dans la circulation sanguine, déclenchent une infection systémique pour atteindre progressivement le système nerveux central et déclencher une méningo-encéphalite. *C. neoformans* est capable de traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) par plusieurs mécanismes et surtout par la stratégie du

« cheval de Troie » au travers des monocytes. Il est transporté au travers de ces cellules phagocytaires dans le parenchyme cérébral (Santangelo, R. *et al.* 2004; Charlier, C. *et al.* 2009).

### III. La réponse immunitaire

De nombreux pathogènes sont capables de s'introduire dans l'organisme, de façon invasive ou discrète, en déclenchant chez l'hôte des mécanismes de défense. La réponse immunitaire innée est la première réaction non spécifique qui se met en place. Puis quand cela est nécessaire, une réaction immunitaire adaptative s'installe.

#### III.1. Immunité innée

L'immunité innée est le premier processus de défense de l'organisme mis en place contre une agression extérieure. Cette réponse est rapide, sans mémoire immunitaire et indépendante de l'antigène. De nombreuses situations d'agression (blessures, infection virale ou bactérienne, etc.) mènent à des réactions innées similaires. La réponse innée est constituée de plusieurs dispositifs de défense :

- Tout d'abord les barrières naturelles : la peau et les muqueuses (digestive, pulmonaire, etc.) constituent des barrières physiques en protégeant l'organisme contre les éléments extérieurs grâce aux épithéliums, ce qui assure une perméabilité sélective.
- Les poils, les cils et le mucus augmentent l'efficacité de cette protection en repoussant davantage les microorganismes étrangers.
- Puis une défense biochimique qui renforce les barrières naturelles grâce à la sécrétion de protéines et de peptides antimicrobiens (larmes, salives, mucus, ...) moyens de défense très efficace qui empêchent le développement d'un grand nombre de microorganismes. La présence d'une flore commensale constitue également une barrière naturelle dans certains organes (en particulier le tube digestif) en empêchant la croissance de microorganismes saprophytes et pathogènes de l'environnement.

Lorsque accidentellement ces barrières sont franchies, une réaction inflammatoire va se mettre en place au travers de cellules peu spécifiques. Les quatre signes de la réaction inflammatoire sont la rougeur, la chaleur, la douleur et l'œdème. Les cellules blanches du sang se rendent rapidement sur le lieu de l'infection pour capturer et digérer les agents infectieux. Des processus d'élimination s'activent : la phagocytose par les cellules phagocytaires et l'activation du système du complément.

### III.1.A. La phagocytose

La phagocytose est un processus visant à éliminer des microorganismes, des débris cellulaires ou encore des particules inertes, pour protéger l'organisme. La phagocytose se met en place par deux processus différents, par opsonisation ou par l'intermédiaire de récepteurs membranaires : Macrophage Mannose Receptor (MMR), récepteurs aux lectines et des récepteurs scavengers, présents sur les cellules spécifiques. Ces récepteurs permettent une interaction directe avec l'antigène du microorganisme à éliminer. Cependant la phagocytose peut aussi nécessiter des opsonines qui sont des molécules adaptatrices, permettant de faire le lien entre les cellules phagocytaires et l'antigène. Les immunoglobulines et les constituants du complément sont les opsonines les plus fréquentes.

Une fois l'agent infectieux détecté, le mécanisme de phagocytose se met en place au travers de 4 étapes :

1/ L'attraction et l'adhésion de l'élément étranger par les cellules phagocytaires représentent la première étape de la phagocytose et, ce, par l'intermédiaire de récepteurs membranaires. L'adhésion est facilitée par la présence d'opsonines.

2/ L'ingestion du pathogène se fait par la formation de pseudopodes qui viennent encercler l'élément à phagocyter. Les prolongements des pseudopodes forment une vésicule intracellulaire, le phagosome, qui renferme et capture totalement la cible.

3/ La digestion du pathogène au sein même du phagosome est réalisée grâce à des enzymes telles que le lysozyme, qui vont digérer et dégrader la cible en peptides de petite taille.

4/ Fin de la digestion : il y a expulsion des débris digérés par exocytose dans le milieu extracellulaire.

### III.1.B. Les cellules phagocytaires

Les cellules phagocytaires et, particulièrement les macrophages, ont un rôle déterminant dans le maintien de l'immunité innée.

Le système phagocytaire est riche. Il est constitué de polynucléaires neutrophiles, de macrophages et de cellules dendritiques qui apparaissent dans les tissus après différenciation des monocytes du sang, mais aussi des cellules microgliales au niveau du cerveau et des cellules Natural Killer (NK). Toutes ces cellules circulent dans la lymphe et le sang, avant d'être recrutées sur un site inflammatoire. Les cellules phagocytaires ont des caractéristiques communes comme leur origine hématopoïétique, leur propriété phagocytaire et des marqueurs immunologiques



membranaires. Elles sont actrices au niveau de la réponse innée et font le lien vers une réponse adaptatrice.

Les **monocytes** sont des cellules sanguines mononuclées caractérisés par un noyau en forme de fer à cheval. Ce sont les plus grandes cellules circulant dans le sang. Ils ne se divisent pas et représentent 3 à 5% des cellules sanguines. Leur nombre est variable tout comme leur durée de vie. Ils migrent rapidement vers les tissus pour se différencier en macrophages ou cellules dendritiques.

Les **macrophages** décrits pour la première fois par Elie Metchnikoff en 1883, sont des cellules immunitaires différenciées à partir de monocytes. Leur rôle principal est l'élimination de débris cellulaires (corps apoptotiques et nécrotiques) et de pathogènes par le mécanisme de phagocytose après recrutement sur le site inflammatoire. Ils participent activement à l'immunité innée en tant que défense non spécifique. Les macrophages peuvent devenir cellules présentatrices d'antigène (CPA). Dans ce cas, après avoir « digérer » un microorganisme, le macrophage va être capable de présenter un antigène de manière à stimuler des lymphocytes T spécifiques. Ils participent donc également à l'immunité adaptatrice. Certains organismes peuvent résister à la phagocytose et survivre dans le macrophage, comme *Mycobacterium tuberculosis* ou *Leishmania*.

En condition non inflammatoire, la majorité des macrophages résident dans des endroits stratégiques : des lieux susceptibles d'invasion microbienne et des lieux d'accumulation de débris divers, comme le foie, les poumons, la rate et les tissus conjonctifs en assurant un nettoyage permanent de l'organisme.

Les **cellules dendritiques** sont des cellules immunitaires qui possèdent des prolongements cytoplasmiques : des dendrites. Les cellules dendritiques jouent un rôle important grâce à leur fonction particulière de cellules présentatrices d'antigènes. Elles résident à l'état basal en périphérie. Suite à la phagocytose d'une particule antigénique et/ou à la réception de signaux de danger, elles migrent vers les ganglions lymphoïdes secondaires via les vaisseaux lymphatiques. Devenues cellule présentatrice d'antigène, elles vont présenter l'antigène aux lymphocytes T. Ce qui permet dans un second temps d'activer ces mêmes lymphocytes à produire des cytokines et aussi d'activer les lymphocytes B. Les cellules dendritiques servent de passerelle entre l'immunité innée et l'immunité adaptatrice.

Les **cellules NK** sont des lymphocytes granuleux qui n'appartiennent ni aux lymphocytes T ni aux lymphocytes B. Elles sont capables de lyser spontanément des cellules étrangères à l'organisme de manière indépendante de l'antigène et sans activation préalable. Elles différencient les cellules du « soi », des cellules du « non soi » (c'est à dire les cellules étrangères à l'organisme) et des cellules du « soi modifiées » (c'est à dire les cellules tumorales ou

infectées). Après phagocytose, les NK éliminent les éléments étrangers à l'aide de perforines et de granzymes extracellulaires. Elles sont actives dans la réponse non spécifique.

Les **polynucléaires neutrophiles** sont des cellules présentes dans le sang en quantité importante (supérieure aux macrophages) mais ont une durée de vie courte. Les neutrophiles se déplacent du sang vers les tissus, attirés par les signaux des cytokines libérées par d'autres cellules présentes sur le foyer infectieux. Le processus de phagocytose est fatal pour les neutrophiles.

### III.1.C. Le système du complément

Toutes les molécules du complexe du complément sont désignées par la lettre **C** suivie d'un numéro. L'ordre utilisé correspond à l'ordre de découverte des molécules. Les fragments des molécules après clivage sont désignés par une lettre minuscule. Le système du complément est un groupe de plusieurs protéines sériques (9) qui entrent dans le mécanisme d'élimination des pathogènes en agissant en cascade protéolytique. Deux voies d'activation ne nécessitent pas l'intervention d'anticorps, ce sont la voie alterne et la voie des lectines. Une autre nécessite la présence d'un anticorps, elle est nommée la voie classique. Le complément peut donc être activé indépendamment de la présence des anticorps et de ce fait être acteur dans un premier temps de la mise en place de la réponse innée.

La voie classique est déclenchée par la liaison de la protéine C1 via les anticorps aux antigènes ou directement à la surface des pathogènes. Cette voie comprend les protéines C1, C4 et C2.

La voie alterne est initiée directement par la liaison de la protéine C3 aux membranes cellulaires à la surface des pathogènes. Elle comprend les protéines C3 et les facteurs B et D.

Enfin la voie des lectines, qui ressemble à la voie classique est initiée par la liaison de la Mannane binding-lectin (MBL) à la surface des pathogènes.

Les trois voies d'activation du complément convergent toutes vers la formation d'une C3 convertase qui sera responsable de la génération des molécules effectrices suite aux différents clivages. Elle est alors liée de façon covalente à la surface des pathogènes et clive la molécule C3 en **C3b**, la molécule effectrice la plus importante, et C3a. C3b opsonise les pathogènes et se lie à la C3 convertase pour former la C5 convertase. Celle-ci clive C5 en C5a, et C5b qui permet la formation du complexe d'attaque membranaire (**CAM**) dont la phase finale est la polymérisation de C9. Le CAM crée des pores dans la membrane de certaines bactéries entraînant leur lyse.

## III.2. Immunité adaptative

La réponse adaptative est plus lente à se mettre en place et laisse place à une mémoire immunitaire. Elle est strictement spécifique aux antigènes. Elle est caractérisée par la participation des lymphocytes et la production d'anticorps spécifiques. Les lymphocytes jouent un rôle majeur dans la mise en place de la réponse immunitaire adaptative, grâce aux lymphocytes B (B pour Bown) et aux lymphocytes T (T pour Thymus, lieu de différenciation et de maturation).

Ces deux lignées cellulaires vont engendrer deux types de réaction :

- Réponse immunitaire cellulaire dans le cas de l'activation des lymphocytes T ( $L_T$ )
- Réponse immunitaire humorale dans le cas de l'activation des lymphocytes B ( $L_B$ ).

Les actions des deux types de réponse ont des finalités différentes mais tout en agissant de façon synergique en fonction du microenvironnement, du contact cellulaire et des récepteurs associés. Les deux types de réponse adaptative sont liées par un réseau de communication orchestré par les cytokines (les Interleukines (IL)).

Le déclenchement des réponses cellulaires et humorales débute par la reconnaissance de l'antigène par les  $L_T$  qui entraîne leur activation. Contrairement aux  $L_B$  qui lient directement l'antigène, les  $L_T$  ne reconnaissent l'antigène qu'en association avec des produits du CMH (Complexe Majeur d'Histocompatibilité) exprimés à la surface de cellules, les cellules présentant l'antigène (CPA). L'antigène n'est pas reconnu sous sa forme native, mais uniquement après avoir subi des transformations. C'est sous cette forme modifiée que l'antigène, via la CPA, est reconnu par le récepteur des  $L_T$ . Selon le type d'antigène présenté par le CMH, ceux sont les  $L_{T4}$  (CMH classe 2) ou les  $L_{T8}$  (CMH classe 1) qui vont réaliser ce contact. Chaque lymphocyte ne présentant qu'une sorte de récepteurs, le déterminant antigénique réalise une sélection clonale des  $L_T$ . Les  $L_{T4}$  et les  $L_{T8}$  ainsi sélectionnés sont activés. Cela se traduit, au niveau des  $L_{T4}$ , par une sécrétion de messagers chimiques activateurs : les interleukines (IL). Les  $L_{T4}$  et les  $L_{T8}$  élaborent ensuite des récepteurs membranaires spécifiques sous contrôle d'IL, produites uniquement par les  $L_{T4}$ . Il se produit alors une auto-activation des  $L_{T4}$  et des  $L_{T8}$ .

### III.2.A. Réponse immunitaire à médiation cellulaire

Auto-activés par le fixation de l'IL sur les récepteurs, les  $L_{T4}$  et les  $L_{T8}$  subissent de nombreuses mitoses : c'est l'expansion clonale. Les  $L_{T4}$  "Helpers" deviennent plus nombreux (on les appelle

aussi  $L_T$  auxiliaires). Les  $L_{T8}$  prolifèrent également et se différencient en clones cytolytiques : les  $L_{Tc}$ , qui sont les acteurs de la réaction immunitaire à médiation cellulaire.

Les  $L_{Tc}$ , qui sont les  $L_{T8}$  différenciés, sont capables de lyser les cellules qui sont à l'origine de leur sélection (virus, bactéries, cellules cancéreuses ...). Les IL et les chimiokines sont les médiateurs cellulaires qui permettent la maturation des  $L_T$ , qui organisent le contact cellulaire avec l'antigène et qui programment la destruction de la cible par le phénomène de lyse. Au moment du contact avec la cellule cible, les  $L_{Tc}$  sécrètent une protéine particulière, la perforine, qui est libérée par exocytose et perce la membrane de la cellule cible, ce qui peut provoquer sa destruction.

### III.2.B. Réponse immunitaire à médiation humorale

C'est un épitope de l'antigène qui « sélectionne » les  $L_B$  spécifiques et déclenche la sélection clonale. Le  $L_B$  sélectionné internalise l'antigène capturé par l'anticorps, le dégrade et présente l'épitope + le CMH aux  $L_{T4}$ . Les  $L_{T4}$  deviennent alors des "Helpers" sécrétant des IL. Les IL auto-activent les  $L_{T4}$ , mais aussi les  $L_B$  qui ont élaboré des récepteurs à IL.

Les IL entraînent la multiplication puis la différenciation des  $L_B$  en plasmocytes, cellules productrices d'anticorps circulants, spécifiques de l'antigène. Ces anticorps circulants sont les acteurs de la réaction immunitaire à médiation humorale.

Les clones de plasmocytes sécrètent, dans le milieu intérieur, un grand nombre d'anticorps qui se fixent sur les antigènes et les neutralisent en formant un complexe antigènes-anticorps. Ces anticorps peuvent aussi servir d'opsonines et permettre la phagocytose du pathogène ou de l'antigène. La destruction de l'antigène se fera ensuite principalement par l'activation du système du complément (via la voie classique) en créant le complexe d'attaque qui forme des pores et provoque la lyse de la cellule.

Les  $L_B$  peuvent être activés indépendamment des  $L_T$   $CD4+$ , tels les polysaccharides bactériens ou fongiques, qui sont des antigènes thymo-indépendants.

#### \* Les lymphocytes mémoire

Lorsque les clones de cellules immunocompétentes ( $L_{T4}$  et  $L_B$ ) sont sélectionnés du fait de la présence de l'antigène, une partie ne se différencie pas : ce sont les cellules mémoires qui ont une durée de vie longue et qui interviendront dans l'efficacité des vaccinations par exemple. Ces cellules pourront lors d'un second contact avec le même antigène se diviser et se différencier plus rapidement.

### III.2.C. Les cytokiniques et les chimiokines

Les cytokines, les hormones et les neuromédiateurs sont essentiels à la communication cellulaire. L'interféron est l'une des premières cytokines identifiée en 1957. Les cytokines sont des protéines synthétisables par de nombreux types cellulaires, caractérisées comme des messagers immunitaires qui diffusent les informations. Chaque cytokine possède souvent plusieurs propriétés touchant principalement à 3 composantes : inflammation, immunité et croissance cellulaire. Elles possèdent des caractéristiques communes :

- Pluralité d'origine : elles sont produites par différents types cellulaires. Les macrophages, les NK, les lymphocytes T, les lymphocytes B et les fibroblastes
- Pléiotropisme : elles engendrent des effets différents (activation, inhibition)
- Redondance : plusieurs cytokines ont la même fonction
- Synergie : elles peuvent agir en association
- Antagonisme : action opposée à d'autres.

Il y a plusieurs groupes de cytokines :

- Interférons (IFN)
- Interleukines (IL)
- Médiateurs solubles
- La famille du facteur de nécrose tumorale (TNF)
- Les facteurs de croissance de transformation (TGF)

Les chimiokines sont des molécules indispensables au recrutement et à la migration cellulaires vers les organes lymphoïdes. Elles guident les cellules immunitaires vers le site inflammatoire.

Au cours d'une réponse immunitaire, l'organisme fait prédominer la réponse la mieux adaptée en fonction du type d'antigène à éliminer. Les cellules dendritiques ont un rôle clé dans cette orientation préférentielle puisque qu'elles deviennent cellules présentatrices d'antigène après avoir phagocyté l'antigène. Les cellules présentatrices d'antigène se lient aux  $L_T CD4+$  ce qui va engendrer une différenciation et la multiplication de deux lignées :  $L_{Th}$  et  $L_T CD8+$ . La lignée  $L_{Th}$  est à l'origine de la production de deux types de réponses cytokiniques :

- Réponse de type TH1
- Réponse de type TH2.

La réponse de type TH1 a un rôle dit « pro-inflammatoire », elle aide à la création d'une réponse cellulaire. Elle génère la production de cytokines telles que l'IL-12, l'IFN- $\gamma$ , l'IL-1 et le TNF- $\alpha$ , qui

augmentent l'intensité de la réponse immunitaire. Cette réponse est généralement impliquée contre les pathogènes intracellulaires. La réponse type TH1 régule la réaction immunitaire de plusieurs façons :

- Elle stimule la transformation des monocytes en macrophages
- Elle active les  $L_B$  et les NK
- Elle stimule la production d'IgG opsonisant et d'IgG qui activent le complément, pour conduire à la lyse du pathogène
- Elle déclenche la production d'IFN- $\gamma$  qui inhibe l'induction de la réponse type Th2.

La réponse de type TH2 est dite régulatrice ou « anti-inflammatoire ». Elle est déclenchée pour répondre aux pathogènes extracellulaires. Ces actions principales sont :

- La production d'IL-6 qui stimule la croissance des plasmocytes
- La production d'IL-4 qui augmente la réponse Th2 et inhibe la réponse type Th1 Elle permet aussi la différenciation des  $L_B$  en plasmocytes, spécifiquement pour la sécrétion d'anticorps de type IgE.
- L'IL-5 qui stimule la croissance des éosinophiles
- L'IL-10 qui réprime la réponse des macrophages et inhibe l'induction de la réponse type Th1.

La réponse engendrée par les cytokines est une balance Th1/Th2, qui évolue selon le microenvironnement de la réaction inflammatoire (la quantité d'antigène, la durée de stimulation des  $L_T$ , la stratégie employée par le pathogène, etc.) et vient modifier dans un sens ou dans l'autre le profil de réponse.

#### IV. Réponse Immunitaire à l'infection par *C. neoformans*

En s'introduisant dans l'organisme *C. neoformans* va déclencher les mécanismes de l'immunité innée mais aussi ceux de l'immunité spécifique. La complexité de la mise en place de la réponse immunitaire est liée aussi bien à la diversité de la réponse de l'hôte propre à chaque individu, qu'à la diversité génétique de *C. neoformans*. Ces nombreux paramètres modulent l'efficacité des phases d'une réponse immunitaire classique (Shoham, S. *et al.* 2005; Schop, J. 2007).

## IV.1. La réponse immunitaire innée

La porte d'entrée habituelle étant les voies respiratoires, les macrophages alvéolaires résidant dans les poumons sont la première lignée cellulaire qui rentre en contact avec *C. neoformans* et qui déclenche une réaction de défense au niveau pulmonaire par le processus de phagocytose.

### \* La phagocytose

La capsule polyosidique de *C. neoformans* est son principal facteur de virulence. Elle inhibe le processus de phagocytose par les macrophages, les cellules dendritiques et les polynucléaires neutrophiles (Levitz, S.M. *et al.* 1989; Dong, Z.M. *et al.* 1995; Vecchiarelli, A. *et al.* 2003). Les polyosides (le GXM et le GalXM) de la capsule forment une barrière entre les opsonines nécessaires à la phagocytose et les récepteurs des cellules phagocytaires (Levitz, S.M. *et al.* 1989; McQuiston, T. *et al.* 2011). De plus, *C. neoformans* inhibe spécifiquement la phagocytose orchestrée par le système du complément à travers la production de APP1 (une protéine cytoplasmique anti-phagocytaire), qui se fixe aux récepteurs CR2 et CR3, en empêchant l'internalisation des levures opsonisées (Luberto, C. *et al.* 2003; Stano, P. *et al.* 2009). Tous ces facteurs peuvent partiellement entraîner un retard de la mise en place d'une réaction inflammatoire. Il est donc absolument nécessaire d'ajouter des opsonines (immunoglobulines ou protéines du complément) si l'on veut étudier la phagocytose et les phénomènes associés.

### \* Rôle des facteurs de virulence de *C. neoformans* dans la défense innée

Une fois phagocyté par les macrophages, *C. neoformans* est capable de survivre puis de se multiplier au sein du phagosome. La libération de lysozyme par les macrophages est inactivée par la présence de la capsule. La mélanine assure une protection supplémentaire contre le stress oxydant et les effets des peptides antimicrobiens intra-macrophagiques (Feldmesser, M. *et al.* 2001).

### \* L'extrusion active

En plus des propriétés qui permettent aux levures de subsister dans les macrophages, *C. neoformans* est également capable d'être expulsé vivant du phagosome, par phénomène d'extrusion active (vomocytose). Cette sortie peut entraîner ou non la lyse cellulaire des macrophages. Ce phénomène n'est pas rare puisque qu'il est estimé à une fréquence d'au moins 10% en condition *in vitro*, et permet à *C. neoformans* d'aller infecter d'autres cellules (Alvarez, M. *et al.* 2006; Ma, H. *et al.* 2006; Bliska, J.B. *et al.* 2009). Il faut noter que *C. neoformans* est un pathogène intracellulaire facultatif (Feldmesser, M. *et al.* 2001).

#### \* Les cytokines

Après avoir internalisé les levures, les macrophages produisent des cytokines qui activent le développement de la réponse adaptative, et particulièrement vers une réponse des lymphocytes T (Herring, A.C. *et al.* 2002; Shao, X. *et al.* 2005; Chen, G.H. *et al.* 2008; Guillot, L. *et al.* 2008). Les macrophages contribuent à éliminer les cellules fongiques à travers la formation de granulome impliquant une réponse de type Th1 : avec une expression et une production de TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\gamma$ , d'IL-12 et d'IL-18 (Kawakami, K. *et al.* 2000).

#### \* Rôles des macrophages

L'activité fongicide dépend principalement du type de macrophages étudiés. En effet, les macrophages alvéolaires de rat semblent inhiber efficacement la prolifération des levures *in vitro* et *in vivo* (mise en évidence de lésions granulomateuses), tandis que les macrophages humains et murins sont moins efficaces (Goldman, D.L. *et al.* 2000; Del Poeta, M. 2004; McQuiston, T. *et al.* 2011).

Chez des souris déplétées en macrophages alvéolaires, on observe une dégradation rapide de leur état suite à l'inoculation par *C. neoformans*, suivie d'une mort précoce après une infection pulmonaire sévère (Osterholzer, J.J. *et al.* 2009).

En absence d'une réponse adaptative efficace, les macrophages sont insuffisants pour lutter contre *C. neoformans* et peuvent contribuer à la persistance de cet agent (croissance au sein du macrophage et dissémination) (Arora, S. *et al.* 2005; Charlier, C. *et al.* 2009; Zhang, Y. *et al.* 2009; Hardison, S.E. *et al.* 2010).

#### \* Système du complément

Plusieurs études montrent la participation du système du complément au cours de l'infection par *C. neoformans*. Dans un modèle murin, une étude montre que la déplétion des protéines C3 et C9 entraîne une diminution de l'élimination des levures (Diamond, R.D. *et al.* 1973). Une autre étude menée sur des souris déficientes en fragment C5 met en évidence qu'elles sont plus susceptibles à l'infection et que la cinétique de mortalité est plus rapide après une pneumonie aiguë que pour les souris sauvages (Rhodes, J.C. 1985). Le complément apporterait une opsonine essentielle (C3) et un facteur chimiotactique important (C5a) (Dromer, F. *et al.* 1989).



## IV.2. La réponse immunitaire adaptatrice

Les cellules dendritiques jouent un rôle central dans la défense immunitaire en réponse à *C. neoformans*. En devenant cellules présentatrices d'antigène, elles vont initier la réponse adaptatrice. Cette interaction active des récepteurs spécifiques comme les TLR4 et les récepteurs aux lectines (particulièrement le récepteur au Mannose). Après avoir internalisées les levures, les cellules présentatrices d'antigène présentent des antigènes de *C. neoformans*, en particulier des mannoprotéines, aux cellules (Osterholzer, J.J. *et al.* 2009; Levitz, S.M. 2010).

### IV.2.A. Réponse immunitaire à médiation humorale

Le rôle des anticorps et de la réponse humorale dans le moyen de défense contre *C. neoformans* n'ont pas été clairement démontrés.

La détection d'anticorps contre les antigènes de capsule est fréquente chez des sujets immunocompétents, d'âge et de statut immunitaire différent, en absence de cryptococcose. Ceci indique que le contact avec le pathogène *C. neoformans* est fréquent (Dromer, F. *et al.* 1988; Dromer, F. *et al.* 1988; Ndimbie, O.K. *et al.* 1994; Abadi, J. *et al.* 1999; Abadi, J. *et al.* 1999).

C'est au travers d'expériences menées sur le modèle murin que l'importance de la réponse humorale a été étudiée. L'administration d'anticorps monoclonaux contre des antigènes capsulaires de *C. neoformans* déclenche un effet protecteur contre l'infection. En effet, les survies des animaux sont significativement prolongées et la multiplication des levures est moindre (Dromer, F. *et al.* 1987; Mukherjee, J. *et al.* 1992; Mukherjee, J. *et al.* 1993; Mukherjee, J. *et al.* 1995).

### IV.2.B. Réponse immunitaire à médiation cellulaire et cytokinique

L'activation des diverses lignées phagocytaires permet la mise en place d'une réponse immunitaire cellulaire qui reste insuffisante. La capsule inhibe la production des cytokines ce qui se traduit par une réponse Th1 diminuée et une réponse inflammatoire faible chez l'homme (Kawakami, K. *et al.* 1999; Vecchiarelli, A. 2000; Voelz, K. *et al.* 2010).

Dans la réponse anti-cryptococcique, les perforines des NK vont entraîner une perméabilisation de la paroi de *C. neoformans* puis sa lyse, tandis que les cellules T CD4+ et CD8+ déclenchent ce même processus de lyse via les granzymes (Ma, L.L. *et al.* 2004; Zheng, C.F. *et al.* 2007).

Les cytokines sont exprimées aux différentes étapes de l'infection : primo-infection, réactivation et dissémination et stade méningo-encéphalite. Pour avoir une réponse appropriée à la stratégie

opportuniste de *C. neoformans*, il semble essentiel de considérer les réponses type Th1, Th2 et Th17 (Voelz, K. *et al.* 2010).

L'IL-12, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  sont des cytokines de la réponse de type Th1 qui sont associés au contrôle de l'infection et à l'élimination des levures. Elles permettent la mise en place d'une immunité protectrice (Wozniak, K.L. *et al.* 2011). L'interleukine-17 participe également à la protection associée à une réponse type Th17 via les neutrophiles (Voelz, K. *et al.* 2010; Wozniak, K.L. *et al.* 2011). Une réponse type Th2 active est mise en évidence dans des modèles expérimentaux *in vivo*, avec la production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10 et d'IL-13 et une exacerbation de l'infection (Wozniak, K.L. *et al.* 2011).

Le rôle des  $L_T$  et en particulier les CD4+, est démontré par l'incidence de la cryptococcose, provoqué par le SIDA qui engendre un fort déficit immunitaire ( $< 25 L_T/mm^3$ , chiffre du CNRMA) correspondant à une chute de la réponse Th1.

## V. Outils d'études

### V.1. Les modèles d'études de la réponse immunitaire

#### V.1.A. Modèles *in vitro*

Plusieurs modèles *in vitro* ont été développés pour étudier la réponse immunitaire provoquée par *C. neoformans* après interaction avec différentes populations cellulaires immunitaires de l'hôte.

##### \* Le TNF- $\alpha$

Chaka W. et son équipe ont mené plusieurs expériences sur l'activation du TNF- $\alpha$  par les cellules mononuclées de sang humain (PBMC). En effet, le TNF- $\alpha$  est une cytokine clé au niveau de la réponse inflammatoire, elle a donc été largement étudiée dans la mise en place de la réponse anti-cryptococcique. La première observation concerne le niveau de production de cette cytokine qui est dose dépendante de la quantité de levure. Le niveau de production du TNF- $\alpha$  est 4 fois supérieur pour un ratio de 10/1 *C. neoformans*/PBMC que pour un ratio de 1/1. Les auteurs observent également que selon les conditions expérimentales d'interaction, la cinétique de production est différente. La production de TNF- $\alpha$  est 3 fois plus importante à 3H quand

l'interaction est faite dans un volume réduit ou en tube avec ou sans agitation qu'à 18H. En revanche, la cinétique de production du TNF- $\alpha$  est 1,5 fois plus importante à 18H qu'à 3H quand l'interaction est faite dans un grand volume sans agitation (2ml en tube). Cette étude conclue que la production du TNF- $\alpha$  en condition *in vitro* est développée plus rapidement quand l'interaction est faite sous agitation et que le niveau de production est moindre dans un grand volume. Les conditions expérimentales influencent clairement la cinétique de production du TNF- $\alpha$  par les phagocytes et nécessitent donc une standardisation préalable avant toute étude (Chaka, W. *et al.* 1997).

Levitz S.M *et al.*, ont testé l'expression et la production du TNF- $\alpha$  dans les PBMC humains et plus particulièrement dans les sous populations mononuclées. En effet, l'activation du TNF- $\alpha$  est différente selon la sous population étudiée. Après maturation et différenciation, les monocytes sanguins et les macrophages alvéolaires (PAM) sont les deux types cellulaires prédominants qui produisent du TNF- $\alpha$  en présence de *C. neoformans*. Les lymphocytes T, les cellules NK et les neutrophiles peuvent produire du TNF- $\alpha$  mais en moindre mesure et sous certaines conditions. Cette équipe met également en avant que la quantité libérée de TNF- $\alpha$  est dépendante de la taille de la capsule et de la présence d'opsonine (Levitz, S.M. *et al.* 1994).

#### \* Rôle du GXM dans l'activation de certaines cytokines pro et anti-inflammatoires

La production de cytokines pro-inflammatoires est observée sur des polynucléaires neutrophiles humains (PMN) après stimulation par différentes souches de *C. neoformans*. Les interleukines IL-6, IL-8 et IL-1 $\beta$  ainsi que le TNF- $\alpha$  sont produites selon une cinétique particulière en fonction de la taille de la capsule des souches sélectionnées. L'IL-1 $\beta$  est produite par les PMN après 18H de contact que les souches possèdent une fine ou une épaisse capsule. Cependant, la production est plus intense à mesure que la taille de la capsule est plus épaisse. Le comportement de l'IL-8 est similaire à celui de l'IL-1 $\beta$ . En revanche, la cinétique d'activation de IL-6 et du TNF- $\alpha$  débute plus précocement. La production de ces deux cytokines est dosable à partir de 3H de contact et continue pour les temps 6H et 18H où le niveau devient plus important (IL-6 est 2,5 fois plus exprimée à 18H qu'à 3H et le TNF- $\alpha$  est 3 fois plus exprimé à 18H qu'à 3H). Les niveaux de production de d'IL-6 et du TNF- $\alpha$  sont également dose dépendante de la taille de la capsule. Ces observations mettent en évidence le rôle du polyside GXM de la capsule comme co-initiateur de la réponse immunitaire et dans la production de cytokines en réponse à *C. neoformans* (Retini, C. *et al.* 1996).

#### \* Rôle anti-inflammatoire de l'IL-10

Indépendamment, cette même équipe a poursuivi son travail en étudiant la production d'IL-10 avec les mêmes souches, en ajoutant une condition : du GXM purifié, sur des monocytes

humains. La production d'IL-10 est significativement plus précoce et prolongée jusqu'au temps 48H comparée à toutes les cytokines préalablement dosées. De plus, les auteurs ont travaillé sur le rôle anti-inflammatoire de l'IL-10. En présence d'un anticorps anti-IL-10, ils ont mis en évidence que la production du TNF- $\alpha$  était augmentée jusqu'à 3 fois et de 6 fois pour l'IL-1 $\beta$ , après une stimulation de 18H par *C. neoformans*. Ces données sont cohérentes avec les résultats de Levitz S.M. (1996) sur l'inhibition des cytokines pro inflammatoires (TNF- $\alpha$  et l'IL-1 $\beta$ ) par l'IL-10 dans les PBMC. L'IL-10 est reconnu comme étant un puissant anti-inflammatoire (Vecchiarelli, A. *et al.* 1996).

#### \* L'IFN- $\gamma$

Des expériences étudiant l'activation de plusieurs cytokines, enzymes et récepteurs membranaires de macrophages alvéolaires ont été réalisées par des dosages d'expression par PCR en temps réel, par des marquages en cytométrie en flux, par des marquages en immunohistochimie et également par des dosages de cytokines en ELISA. Les expériences ont été réalisées sur des macrophages alvéolaires issus de souris infectées par les souches H99 de *C. neoformans* et H99 $\gamma$  (souche produisant de l'Interféron $\gamma$ ). Ce travail met en évidence l'importance de l'IFN- $\gamma$  dans la réponse anti-cryptococcique. Dans les macrophages H99- $\gamma$ , la réponse type TH1 est plus forte que dans les macrophages H99, par production d'IL-2 et d'IL-12 à J7. De plus, les auteurs mettent en évidence, le déclenchement d'une réponse type TH17 par production d'IL-17 à J7 et J14, qui est inexistante dans les macrophages H99. iNOS, FIZZ-1 et le récepteur au mannose sont peu ou non exprimés dans les macrophages H99. Ces marqueurs sont le reflet d'une réaction inflammatoire fonctionnelle et d'une action fongicide efficace par les macrophages. Toutes ces données montrent l'importance de l'IFN- $\gamma$  dans la rapidité d'élimination de *C. neoformans* ainsi que dans la rapidité de résolution de la réaction inflammatoire locale. De plus, ces expériences montrent la nécessité de la mise en place d'une réponse type TH1 et la production de l'IL-17 pour enclencher une réponse de type TH17 protectrice (Hardison, S.E. *et al.* 2010).

### V.1.B. Modèles *in vivo*

#### \* La souris

La grande majorité des études *in vivo* sont menées sur des modèles murins de lignées différentes. L'inoculation des levures se fait par deux principales voies d'administration : intraveineuse et intranasale/intratrachéale, en fonction des paramètres étudiés.

La voie intraveineuse est la plus utilisée, elle permet d'étudier la dissémination fongique et l'invasion du système nerveux central. Elle permet de contrôler précisément l'inoculum. Cependant ce mode d'inoculation contourne la phase de primo-infection pulmonaire. Ce modèle a été mis au point et utilisé au laboratoire sur des souris non congéniques, afin de mimer la diversité génétique de la population humaine (Lortholary, O. *et al.* 1999; Chretien, F. *et al.* 2002). Ce protocole a été optimisé avec les deux sérotypes de *C. neoformans*. Selon l'inoculum ce modèle reproduit une fongémie et une méningo-encéphalite mortelle. De plus, les dosages de cytokines dans le sérum ont montré une production des médiateurs inflammatoires et anti-inflammatoires (TNF- $\alpha$  et l'IL-10), entièrement comparable à celle mesurée dans les sérums et les LCR de patients en phase disséminée de la maladie (Lortholary, O. *et al.* 1999; Lortholary, O. *et al.* 2001).

Une étude menée sur des souris prétraitées au LPS avant (ou juste après (jour 1 < traitement < jour 3) l'inoculation de *C. neoformans* augmente significativement la survie des animaux. Ce prétraitement induit une production précoce de cytokines et particulièrement du TNF- $\alpha$ , déclenchant à un effet protecteur (Rayhane, N. *et al.* 2000).

La voie nasale est une voie qui permet d'étudier la cryptococcose dans son intégralité, à partir de la primo-infection pulmonaire jusqu'à l'invasion cérébrale en fonction de la souche de *C. neoformans* utilisée et de la lignée de souris. Ce modèle mime la pathologie humaine (Mitchell, T.G. *et al.* 1995).

Les conclusions supportées par Hardison S.E. et al., sont appuyées et complétées par le travail de Arora S.. Cette équipe a étudié l'effet des cytokines sur la polarisation des macrophages pendant la primo infection pulmonaire sur les souris déficientes pour l'IL-4 (IL-4<sup>-/-</sup>) et sur des souris déficientes pour l'IFN- $\gamma$  (l'IFN- $\gamma$  <sup>-/-</sup>) (inoculées par voie intratrachéale). L'activation trop précoce de cytokines de type TH2 mène fatalement à la maladie chronique, même si celle-ci est rapidement suivie d'une production d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$ . Sur le modèle de souris IL-4<sup>-/-</sup> on observe la mise en place d'une réponse intense de type TH1 qui permet le contrôle efficace de l'infection et l'absence de pathologie pulmonaire. Cette réponse de type TH1 se met en place par l'activation de gènes tels que Arg1 et iNOS, qui sont peu ou pas exprimés dans les souris sauvages. L'infection serait contrôlée principalement par l'activation de l'IFN- $\gamma$  et la régulation de l'IL-4. La balance entre les cytokines de la réponse type TH1 et TH2 est la clé d'une réaction inflammatoire locale maîtrisée (Arora, S. *et al.* 2011).

#### \* Le lapin

Le lapin possède une résistance naturelle à la cryptococcose. Il est utilisé pour étudier des infections localisées. Aucune dissémination fongique n'est observée. La température physiologique du lapin serait trop élevée pour permettre la survie et la croissance de *C.*

*neoformans*. L'injection de levure doit donc être pratiquée en intracérébrale et l'animal doit subir parallèlement un traitement aux corticoïdes pour déclencher une immunosuppression (Perfect, J.R. *et al.* 1980).

#### \* Le rat

Le rat a été utilisé pour étudier des caractéristiques de la dormance (Goldman, D. *et al.* 1994). En effet, l'inoculation intratrachéale des levures conduit à une primo-infection limitée avec une faible dissémination fongique et une guérison spontanée. Ces observations sont les mêmes chez un sujet immunocompétent qui contrôle l'infection pulmonaire. Ce modèle a permis de mettre en évidence la persistance des levures ou des dérivés capsulaires dans les macrophages pulmonaires localisés dans des lésions granulomateuses (Goldman, D. *et al.* 1994; Goldman, D.L. *et al.* 2000).

#### \* Les modèles animaux non mammifères

Plusieurs modèles non mammifères sont utilisés. En particulier les amibes *Acanthamoeba polyphaga* et *A. castellanii*. Les mécanismes de phagocytose et de dégradation des levures mis en place dans ces hôtes sont très proches de ceux retrouvés dans des macrophages (Steenbergen, J.N. *et al.* 2001).

Un modèle basé sur l'utilisation de larve du papillon *Galleria mollenella* est utilisé pour étudier la virulence de *C. neoformans* et pour comparer les réponses aux traitements antifongiques. La mise en œuvre de ce modèle est plus rapide que des expériences sur souris et permet aussi d'augmenter le nombre de paramètres à étudier au sein d'une même expérience (Mylonakis, E. *et al.* 2005; Fuchs, B.B. *et al.* 2010).

## V.2. Etude de l'expression par PCR en temps réel

### V.2.A. Principe de la PCR en temps réel

Pour analyser l'expression des messagers cytokiniques cibles, la technique de choix est la PCR en temps réel nommée aussi qPCR (pour PCR quantitative).

La PCR est une technique qui permet d'amplifier *in vitro* de façon rapide et sélective une portion d'ADN (délimitée spécifiquement par un couple d'amorces) des gènes sélectionnés. Après optimisation du protocole d'amplification, on peut générer des millions de copies d'une cible présente en très faible quantité et donc quantifier la quantité initiale dans l'échantillon.

La PCR en temps réel est une version améliorée de la réaction de PCR conventionnelle, elle permet, grâce à l'utilisation de molécules fluorescentes, une visualisation de l'amplification en

direct, en temps réel. Cette technique permet de mesurer les amplifications tout au long de la réaction et non en point final comme avec une PCR classique. Les étapes de la qPCR sont les mêmes que celles de la PCR : dénaturation, hybridation et élongation, avec une étape supplémentaire dite de « fusion ».

A chaque cycle d'amplification, l'intensité de l'émission de fluorescence mesurée sera directement proportionnelle à la quantité d'amplicons formée.

Plusieurs systèmes de détection peuvent être utilisés en qPCR. On retrouve deux types de méthodes : la détection à l'aide d'agents intercalant où la spécificité de l'amplification repose uniquement sur le choix des amorces et la détection utilisant des sondes où la spécificité est contrôlée par une sonde spécifique en plus des amorces.

Il existe plusieurs technologies différentes utilisant les sondes (Taqman, FRET, Molecular Beacons). Ces technologies font appel à l'utilisation de sondes oligonucléotidiques auxquelles est couplé un fluorochrome. Elles vont s'hybrider à une séquence cible d'ADN (en plus des amorces d'amplification) et augmenteront la spécificité de l'amplification. Ces méthodes sont plus sensibles mais coûteuses puisqu'elles nécessitent une sonde spécifique supplémentaire pour chaque cible recherchée.

Nous avons choisi la méthode des agents intercalant et plus particulièrement le SYBR Green®. Cet agent est peu fluorescent à l'état libre. L'intensité de fluorescence est augmentée quand il se lie à l'ADN double brin, sans inhiber la réaction de PCR. L'augmentation de la fluorescence mesurée est proportionnelle au nombre de produits amplifiés formés.

Pour vérifier la spécificité, c'est à dire qu'un seul produit a été amplifié, on réalise une courbe dite « de fusion » en fin de réaction. A la fin du protocole d'amplification, les amplicons sont soumis à une augmentation de température progressive, effectuée par palier de 0,5°C, de 55°C à 95°C, en mesurant l'intensité de fluorescence de façon continue. Le point de fusion, nommé « T<sub>m</sub> », correspond à la température à laquelle l'amplicon est sous forme équimolaire double brin et simple brin (50%/50%). Le logiciel embarqué calculera et convertira la dérivée négative de ce point représenté sous forme d'histogramme (un exemple est représenté ci-dessous). Pour une seule et même cible recherchée dans une expérience, tous les échantillons posséderont la même valeur de T<sub>m</sub>.

Les résultats d'amplification de la qPCR sont représentés graphiquement sous forme de courbes sigmoïdes. Chaque courbe correspond à un puits, un échantillon. Ces courbes représentent les mesures de fluorescence émises pour chaque cycle. Le signal seuil calculé automatiquement par

la machine, nommé « bruit de fond », est matérialisé sur le graphe par une ligne horizontale orange.

Si on suit la fluorescence au cours de la réaction, elle se dessine en trois étapes:

- La phase de bruit de fond : la quantité de la cible amplifiée est insuffisante, elle ne dépasse pas le bruit de fond et elle est donc non détectable.
- La phase exponentielle de croissance : la quantité amplifiée de la cible génère un signal de fluorescence supérieur au bruit de fond. Puis la quantité d'amplicons double à chaque cycle en condition optimale de PCR. Ces données peuvent être extrapolées de façon logarithmique dont les valeurs donnent naissance à une droite.
- La phase de plateau : certains composants du milieu réactionnel deviennent limitant. L'amplification n'est plus exponentielle.

La visualisation de la présence d'une cible et sa quantification sont déterminées par le nombre de cycles d'amplification à partir duquel le produit est détectable. Une fois que le niveau de fluorescence émis est significativement différent du bruit de fond, on obtient un numéro de cycle de PCR appelé « Ct », pour « Cycle Threshold », déterminé par le logiciel embarqué de la machine.

Cette valeur est dépendante de la quantité de matrice initialement présente dans l'échantillon testé. Plus la cible recherchée est présente en quantité importante dans l'échantillon à doser, plus le signal généré est précoce puisque peu de cycles seront nécessaires pour l'amplifier, donnant une valeur de Ct faible. A l'inverse si la cible est présente en faible quantité, la valeur de Ct sera élevée en raison du nombre important de cycles pour la détecter. Le Ct est à la base de la précision, de la reproductibilité de la technique et à l'origine de la quantification relative et absolue.

## V.2.B. Préparation à la PCR en temps réel

### V.2.B.1. Matrice biologique

Les ARN sont transcrits dans le noyau de la cellule à partir d'ADN, pour passer ensuite dans le cytoplasme où ils se lieront aux ribosomes. L'ARN est le support génétique intermédiaire aux gènes de la cellule pour fabriquer les protéines.

### V.2.B.2. Critères d'évaluation de la qualité de la matrice



Utiliser la PCR en temps réel afin de réaliser l'étude de l'expression génique nécessite au préalable la validation de plusieurs paramètres.

Pour s'assurer de l'exactitude des résultats obtenus par qPCR, il est nécessaire de générer et d'obtenir des acides nucléiques de bonne qualité. Les ARNs purs, non contaminés en quantité satisfaisante permettront de réaliser une synthèse optimale des ADNc. De même la bonne qualité des ADNc qui seront amplifiés par qPCR est un paramètre important dans la méthode de quantification, dans la fiabilité et pour la reproductibilité des données.

Les indicateurs de qualité des préparations d'ARN sont l'évaluation des rapports d'absorbance 260/280nm et 260/230nm, dosés par spectrophotométrie (type Nanodrop®). La longueur d'onde « 260nm » est la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques. Une seconde mesure faite à « 280nm » permet de contrôler la pureté de l'échantillon en décelant la présence de protéines résiduelles qui absorbent à cette longueur d'onde. Il est important d'obtenir un ratio de 260/280nm  $\geq$  1,8, reflétant une pureté optimale et une contamination protéique minimale.

Le rapport 260/230 permet de contrôler la qualité des échantillons en dosant les éventuels résidus organiques. De la même façon, ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2,0, pour s'assurer d'une contamination organique minimale dans les préparations.

Si ces deux indicateurs de pureté donnent des valeurs inférieures, cela se traduira par des inhibitions de synthèse et d'amplification des deux étapes suivantes (synthèse des ADNc, amplification par qPCR).

Les ADNc rétro-transcrits à partir des ARNs sont évalués avec les mêmes indicateurs de pureté. Si les indicateurs évaluent une qualité moyenne des ADNc, l'efficacité et la spécificité de la qPCR ne pourra pas être maximale.

### V.2.B.3. Gène de référence

La présence d'un gène de référence ou gène de ménage est un paramètre nécessaire dans toute expérience de quantification génique par qPCR. Sa mesure doit être validée. Ce gène doit avoir une expression constitutive, stable et reproductible quelles que soient les conditions expérimentales mises en place. Son utilisation permettra de relativiser toutes les variations en transcrits d'ARNm spécifiques des gènes cibles liées à la technologie ou aux différences de conditions expérimentales dans les échantillons à tester.

## V.2.C. Méthodologie d'analyse selon la méthode Roche

L'analyse des données d'expression générées par qPCR peut être faite selon différentes méthodes : la quantification absolue, la quantification absolue relative, la quantification absolue normalisée ou encore la méthode  $\Delta\Delta CT$ .

### V.2.C.1. Quantification absolue

La quantification absolue permet d'avoir une appréciation exacte de la cible recherchée dans un échantillon. Pour cela, il est nécessaire de réaliser une courbe standard de référence (nommée par la suite courbe standard) constituée par l'amplification d'une gamme de dilutions d'ADN de concentrations connues pour lesquelles, une concentration donnée correspondra à une valeur de Ct. Ainsi, par extrapolation par rapport à sa courbe standard, le Ct obtenu pour un échantillon inconnu sera reporté sur cette courbe standard. Le résultat sera exprimé sous forme de concentration en ADN ou en nombre de copies/ $\mu\text{l}$ . Par cette méthode d'analyse on peut déterminer le nombre absolu de particules infectieuses (par exemple virales) dans un échantillon biologique.

### V.2.C.2. Quantification absolue relative

On peut également analyser les résultats en les relativisant par rapport à un gène de référence. Pour cela, dans chaque échantillon, on va déterminer la concentration du gène cible ( $[C^\circ]$  cible) et la concentration du gène de référence ( $[C^\circ]$  réf) en s'appuyant sur les courbes standard de chacun des gènes. Puis on va relativiser la mesure du gène cible par celle du gène de référence pour chacun des échantillons.

$$\text{Ratio} = \frac{[C^\circ] \text{ cible}}{[C^\circ] \text{ gène de référence}}$$

Cette méthode de calcul permet de minimiser les variations dues aux conditions expérimentales (quantité et qualité des échantillons, variations de pipetage, qualité des acides nucléiques, etc.). La quantification absolue relative s'exprimera sous forme de ratio.

### V.2.C.3. Quantification relative normalisée

Les données absolues sont donc relativisées grâce au gène de référence et peuvent en plus être normalisées grâce à un calibrateur. Un calibrateur est une condition expérimentale qui sert de « témoin » dans l'expérience, c'est un homologue comparatif : le temps zéro d'une expérience de cinétique ou bien l'échantillon non infecté pour une expérience d'infection.

$$\text{Ratio} = \frac{\left[ [C^\circ] \text{ cible} / [C^\circ] \text{ gène de référence} \right] \text{ Condition à tester}}{\left[ [C^\circ] \text{ cible} / [C^\circ] \text{ gène de référence} \right] \text{ Calibrateur}}$$

La normalisation permet d'exprimer les résultats par apport à l'effet « biologique » connu du calibrateur. La quantification absolue normalisée exprimera les données par un ratio. Ex : à l'instant T, il y a 4 fois plus de gène cible dans l'échantillon inconnu que dans le calibrateur.

### V.2.C.4. Analyse des données par la méthode relative du $\Delta\Delta Ct$

Dans cette méthode d'analyse, l'expression du gène cible et du gène de référence sont dépendantes de l'efficacité de la qPCR et du Ct d'amplification. Cette méthode ne nécessite pas l'utilisation d'une courbe standard. Les résultats sont exprimés par un rapport cible/référence de chaque échantillon normalisé par le rapport cible/référence de l'échantillon calibrateur (Pfaffl, M.W. 2001). Dans cette méthode, la précision du résultat dépend des efficacités de PCR des gènes cibles et référence amplifiés. L'efficacité peut être calculée à partir d'un point connu (valeur de Ct, concentration), ou à partir du point de référence de la courbe standard.

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{cible}})^{\Delta Ct_{\text{cible}} (Ct \text{ référence} - Ct \text{ inconnu})}}{(E_{\text{calibrateur}})^{\Delta Ct_{\text{calibrateur}} (Ct \text{ référence} - Ct \text{ inconnu})}}$$

Il est important de noter que quelle que soit la méthode de calcul utilisée, dans un protocole optimal d'amplification, le résultat sera le même.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Abadi, J., S. Nachman, A.B. Kressel and L. Pirofski (1999). "Cryptococcosis in children with AIDS." *Clin Infect Dis* **28**(2): 309-313.
- Abadi, J. and L. Pirofski (1999). "Antibodies reactive with the cryptococcal capsular polysaccharide glucuronoxylomannan are present in sera from children with and without human immunodeficiency virus infection." *J Infect Dis* **180**(3): 915-919.
- Alanio, A., M. Desnos-Ollivier and F. Dromer (2011). "Dynamics of *Cryptococcus neoformans*-macrophage interactions reveal that fungal background influences outcome during cryptococcal meningoencephalitis in humans." *MBio* **2**(4).
- Alvarez, M. and A. Casadevall (2006). "Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages." *Curr Biol* **16**(21): 2161-2165.
- Arora, S., Y. Hernandez, J.R. Erb-Downward, R.A. McDonald, G.B. Toews and G.B. Huffnagle (2005). "Role of IFN-gamma in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis." *J Immunol* **174**(10): 6346-6356.
- Arora, S., M.A. Olszewski, T.M. Tsang, R.A. McDonald, G.B. Toews and G.B. Huffnagle (2011). "Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*." *Infect Immun* **79**(5): 1915-1926.
- Ben-Abdallah, M., A. Sturny-Leclere, P. Ave, A. Louise, F. Moyrand, F. Weih, G. Janbon and S. Memet (2012). "Fungal-induced cell cycle impairment, chromosome instability and apoptosis via differential activation of NF-kappaB." *PLoS Pathog* **8**(3): e1002555.
- Bliska, J.B. and A. Casadevall (2009). "Intracellular pathogenic bacteria and fungi--a case of convergent evolution?" *Nat Rev Microbiol* **7**(2): 165-171.
- Bose, I., A.J. Reese, J.J. Ory, G. Janbon and T.L. Doering (2003). "A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*." *Eukaryot Cell* **2**(4): 655-663.
- Casadevall, A. and J.R. Perfect (1998). *Cryptococcus neoformans*. Washington, ASM Press.
- Chaka, W., A.F. Verheul and A.I. Hoepelman (1997). "Influence of different conditions on kinetics of tumor necrosis factor alpha release by peripheral blood mononuclear cells after stimulation with *Cryptococcus neoformans*: a possible explanation for different results." *Clin Diagn Lab Immunol* **4**(6): 792-794.
- Charlier, C., K. Nielsen, S. Daou, M. Brigitte, F. Chretien and F. Dromer (2009). "Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*." *Infect Immun* **77**(1): 120-127.
- Chen, G.H., D.A. McNamara, Y. Hernandez, G.B. Huffnagle, G.B. Toews and M.A. Olszewski (2008). "Inheritance of immune polarization patterns is linked to resistance versus susceptibility to *Cryptococcus neoformans* in a mouse model." *Infect Immun* **76**(6): 2379-2391.
- Chen, L.C., D.L. Goldman, T.L. Doering, L. Pirofski and A. Casadevall (1999). "Antibody response to *Cryptococcus neoformans* proteins in rodents and humans." *Infect Immun* **67**(5): 2218-2224.
- Chretien, F., O. Lortholary, I. Kansau, S. Neuville, F. Gray and F. Dromer (2002). "Pathogenesis of cerebral *Cryptococcus neoformans* infection after fungemia." *J Infect Dis* **186**(4): 522-530.
- Datta, K., K.H. Bartlett and K.A. Marr (2009). "*Cryptococcus gattii*: Emergence in Western North America: Exploitation of a Novel Ecological Niche." *Interdiscip Perspect Infect Dis* **2009**: 176532.
- De Jager, W., H. te Velthuis, B.J. Prakken, W. Kuis and G.T. Rijkers (2003). "Simultaneous detection of 15 human cytokines in a single sample of stimulated peripheral blood mononuclear cells." *Clin Diagn Lab Immunol* **10**(1): 133-139.
- Del Poeta, M. (2004). "Role of phagocytosis in the virulence of *Cryptococcus neoformans*." *Eukaryot Cell* **3**(5): 1067-1075.
- Desnos-Ollivier, M., S. Patel, A.R. Spaulding, C. Charlier, D. Garcia-Hermoso, K. Nielsen and F. Dromer (2010). "Mixed infections and *In Vivo* evolution in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*." *mBio* **1**(1).

- Diamond, R.D., J.E. May, M. Kane, M.M. Frank and J.E. Bennett (1973). "The role of late complement components and the alternate complement pathway in experimental cryptococcosis." Proc Soc Exp Biol Med **144**(1): 312-315.
- Dong, Z.M. and J.W. Murphy (1995). "Effects of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion." Infect Immun **63**(7): 2632-2644.
- Dromer, F., P. Aucouturier, J.P. Clauvel, G. Saimot and P. Yeni (1988). "Cryptococcus neoformans antibody levels in patients with AIDS." Scand J Infect Dis **20**(3): 283-285.
- Dromer, F., E. Gueho, O. Ronin and B. Dupont (1993). "Serotyping of *Cryptococcus neoformans* by using a monoclonal antibody specific for capsular polysaccharide." J Clin Microbiol **31**(2): 359-363.
- Dromer, F. and O. Lortholary (2003). Annales de l'Institut Pasteur/Actualités: Les Mycoses, Elsevier.
- Dromer, F., S. Mathoulin-Pelissier, O. Launay and O. Lortholary (2007). "Determinants of disease presentation and outcome during cryptococcosis: the CryptoA/D study." PLoS Med **4**(2): e21.
- Dromer, F., S. Mathoulin, B. Dupont, L. Letenneur and O. Ronin (1996). "Individual and environmental factors associated with infection due to *Cryptococcus neoformans* serotype D. French Cryptococcosis Study Group." Clin Infect Dis **23**(1): 91-96.
- Dromer, F., C. Perronne, J. Barge, J.L. Vilde and P. Yeni (1989). "Role of IgG and complement component C5 in the initial course of experimental cryptococcosis." Clin Exp Immunol **78**(3): 412-417.
- Dromer, F., J. Salamero, A. Contrepolis, C. Carbon and P. Yeni (1987). "Production, characterization, and antibody specificity of a mouse monoclonal antibody reactive with *Cryptococcus neoformans* capsular polysaccharide." Infect Immun **55**(3): 742-748.
- Dromer, F., P. Yeni and J. Charreire (1988). "Genetic control of the humoral response to cryptococcal capsular polysaccharide in mice." Immunogenetics **28**(6): 417-424.
- Feldmesser, M., S. Tucker and A. Casadevall (2001). "Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*." Trends Microbiol **9**(6): 273-278.
- Fuchs, B.B., E. O'Brien, J.B. Khoury and E. Mylonakis (2010). "Methods for using *Galleria mellonella* as a model host to study fungal pathogenesis." Virulence **1**(6): 475-482.
- Garcia-Hermoso, D., G. Janbon and F. Dromer (1999). "Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection." J Clin Microbiol **37**(10): 3204-3209.
- Goldman, D., S.C. Lee and A. Casadevall (1994). "Pathogenesis of pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in the rat." Infect Immun **62**(11): 4755-4761.
- Goldman, D.L., H. Khine, J. Abadi, D.J. Lindenberg, L. Pirofski, R. Niang and A. Casadevall (2001). "Serologic evidence for *Cryptococcus neoformans* infection in early childhood." Pediatrics **107**(5): E66.
- Goldman, D.L., S.C. Lee, A.J. Mednick, L. Montella and A. Casadevall (2000). "Persistent *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection in the rat is associated with intracellular parasitism, decreased inducible nitric oxide synthase expression, and altered antibody responsiveness to cryptococcal polysaccharide." Infect Immun **68**(2): 832-838.
- Guillot, L., S.F. Carroll, R. Homer and S.T. Qureshi (2008). "Enhanced innate immune responsiveness to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with resistance to progressive infection." Infect Immun **76**(10): 4745-4756.
- Hardison, S.E., S. Ravi, K.L. Wozniak, M.L. Young, M.A. Olszewski and F.L. Wormley, Jr. (2010). "Pulmonary infection with an interferon-gamma-producing *Cryptococcus neoformans* strain results in classical macrophage activation and protection." Am J Pathol **176**(2): 774-785.
- Herring, A.C., J. Lee, R.A. McDonald, G.B. Toews and G.B. Huffnagle (2002). "Induction of interleukin-12 and gamma interferon requires tumor necrosis factor alpha for protective T1-cell-mediated immunity to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection." Infect Immun **70**(6): 2959-2964.

- Kawakami, K., M. Hossain Qureshi, T. Zhang, Y. Koguchi, Q. Xie, M. Kurimoto and A. Saito (1999). "Interleukin-4 weakens host resistance to pulmonary and disseminated cryptococcal infection caused by combined treatment with interferon-gamma-inducing cytokines." *Cell Immunol* **197**(1): 55-61.
- Kawakami, K., Y. Koguchi, M.H. Qureshi, S. Yara, Y. Kinjo, K. Uezu and A. Saito (2000). "NK cells eliminate *Cryptococcus neoformans* by potentiating the fungicidal activity of macrophages rather than by directly killing them upon stimulation with IL-12 and IL-18." *Microbiol Immunol* **44**(12): 1043-1050.
- Kidd, S.E., Y. Chow, S. Mak, P.J. Bach, H. Chen, A.O. Hingston, J.W. Kronstad and K.H. Bartlett (2007). "Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States." *Appl Environ Microbiol* **73**(5): 1433-1443.
- Kwon-Chung, K.J., J.R. Perfect and S.M. Levitz (2012). "A Chronological History of the International Conference on Cryptococcus and Cryptococcosis (ICCC), an Invaluable Forum for Growth of the Cryptococcal Research Field and Clinical Practice." *Mycopathologia* **173**(5-6): 287-293.
- Levitz, S.M. (2010). "Innate recognition of fungal cell walls." *PLoS Pathog* **6**(4): e1000758.
- Levitz, S.M. and D.J. DiBenedetto (1989). "Paradoxical role of capsule in murine bronchoalveolar macrophage-mediated killing of *Cryptococcus neoformans*." *J Immunol* **142**(2): 659-665.
- Levitz, S.M., A. Tabuni, H. Kornfeld, C.C. Reardon and D.T. Golenbock (1994). "Production of tumor necrosis factor alpha in human leukocytes stimulated by *Cryptococcus neoformans*." *Infect Immun* **62**(5): 1975-1981.
- Lortholary, O., F. Dromer, S. Mathoulin-Pelissier, C. Fitting, L. Improvisi, J.M. Cavaillon and B. Dupont (2001). "Immune mediators in cerebrospinal fluid during cryptococcosis are influenced by meningeal involvement and human immunodeficiency virus serostatus." *J Infect Dis* **183**(2): 294-302.
- Lortholary, O., L. Improvisi, N. Rayhane, F. Gray, C. Fitting, J.M. Cavaillon and F. Dromer (1999). "Cytokine profiles of AIDS patients are similar to those of mice with disseminated *Cryptococcus neoformans* infection." *Infect Immun* **67**(12): 6314-6320.
- Luberto, C., B. Martinez-Marino, D. Taraskiewicz, B. Bolanos, P. Chitano, D.L. Toffaletti, G.M. Cox, J.R. Perfect, Y.A. Hannun, E. Balish and M. Del Poeta (2003). "Identification of App1 as a regulator of phagocytosis and virulence of *Cryptococcus neoformans*." *J Clin Invest* **112**(7): 1080-1094.
- Ma, H., J.E. Croudace, D.A. Lammas and R.C. May (2006). "Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages." *Curr Biol* **16**(21): 2156-2160.
- Ma, L.L., C.L. Wang, G.G. Neely, S. Epelman, A.M. Krensky and C.H. Mody (2004). "NK cells use perforin rather than granzyme for anticryptococcal activity." *J Immunol* **173**(5): 3357-3365.
- Malik, R., P. Martin, D.I. Wigney, D.B. Church, W. Bradley, C.R. Bellenger, W.A. Lamb, V.R. Barrs, S. Foster, S. Hemsley, P.J. Canfield and D.N. Love (1997). "Nasopharyngeal cryptococcosis." *Aust Vet J* **75**(7): 483-488.
- McFadden, D., O. Zaragoza and A. Casadevall (2006). "The capsular dynamics of *Cryptococcus neoformans*." *Trends Microbiol* **14**(11): 497-505.
- McQuiston, T. and M. Del Poeta (2011). The interaction of *Cryptococcus neoformans* with host macrophages and neutrophils. *Cryptococcus from human pathogen to model yeast*. J. Heitman, T. R. Kozel, K. J. Kwon-Chung, J. Perfect and A. Casadevall. Washington, D.C., ASM Press: 373.
- McQuiston, T., C. Luberto and M. Del Poeta (2011). "Role of sphingosine-1-phosphate (S1P) and S1P receptor 2 in the phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by alveolar macrophages." *Microbiology* **157**(Pt 5): 1416-1427.
- Mitchell, T.G. and J.R. Perfect (1995). "Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of *Cryptococcus neoformans*." *Clin Microbiol Rev* **8**(4): 515-548.



- Mukherjee, J., L.A. Pirofski, M.D. Scharff and A. Casadevall (1993). "Antibody-mediated protection in mice with lethal intracerebral *Cryptococcus neoformans* infection." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(8): 3636-3640.
- Mukherjee, J., M.D. Scharff and A. Casadevall (1992). "Protective murine monoclonal antibodies to *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **60**(11): 4534-4541.
- Mukherjee, J., M.D. Scharff and A. Casadevall (1995). "Variable efficacy of passive antibody administration against diverse *Cryptococcus neoformans* strains." Infect Immun **63**(9): 3353-3359.
- Mylonakis, E., R. Moreno, J.B. El Khoury, A. Idnurm, J. Heitman, S.B. Calderwood, F.M. Ausubel and A. Diener (2005). "*Galleria mellonella* as a model system to study *Cryptococcus neoformans* pathogenesis." Infect Immun **73**(7): 3842-3850.
- Nakamura, K., K. Miyagi, Y. Koguchi, Y. Kinjo, K. Uezu, T. Kinjo, M. Akamine, J. Fujita, I. Kawamura, M. Mitsuyama, Y. Adachi, N. Ohno, K. Takeda, S. Akira, A. Miyazato, M. Kaku and K. Kawakami (2006). "Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*." FEMS Immunol Med Microbiol **47**(1): 148-154.
- Ndimbie, O.K., A. Dekker, A.J. Martinez and B. Dixon (1994). "Prostatic sequestration of *Cryptococcus neoformans* in immunocompromised persons treated for cryptococcal meningoencephalitis." Histol Histopathol **9**(4): 643-648.
- Odom, A., S. Muir, E. Lim, D.L. Toffaletti, J. Perfect and J. Heitman (1997). "Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*." EMBO J **16**(10): 2576-2589.
- Osterholzer, J.J., J.E. Milam, G.H. Chen, G.B. Toews, G.B. Huffnagle and M.A. Olszewski (2009). "Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **77**(9): 3749-3758.
- Overbergh, L., A. Giulietti, D. Valckx, R. Decallonne, R. Bouillon and C. Mathieu (2003). "The use of real-time reverse transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression." J Biomol Tech **14**(1): 33-43.
- Park, B.J., K.A. Wannemuehler, B.J. Marston, N. Govender, P.G. Pappas and T.M. Chiller (2009). "Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS." Aids **23**(4): 525-530.
- Perfect, J.R., S.D. Lang and D.T. Durack (1980). "Chronic cryptococcal meningitis: a new experimental model in rabbits." Am J Pathol **101**(1): 177-194.
- Pfaffl, M.W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Randhawa, H.S., T. Kowshik, A. Chowdhary, K. Preeti Sinha, Z.U. Khan, S. Sun and J. Xu (2008). "The expanding host tree species spectrum of *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus neoformans* and their isolations from surrounding soil in India." Med Mycol **46**(8): 823-833.
- Rayhane, N., C. Fitting, O. Lortholary, F. Dromer and J.M. Cavillon (2000). "Administration of endotoxin associated with lipopolysaccharide tolerance protects mice against fungal infection." Infect Immun **68**(6): 3748-3753.
- Retini, C., A. Vecchiarelli, C. Monari, C. Tascini, F. Bistoni and T.R. Kozel (1996). "Capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces proinflammatory cytokine release by human neutrophils." Infect Immun **64**(8): 2897-2903.
- Rhodes, J.C. (1985). "Contribution of complement component C5 to the pathogenesis of experimental murine cryptococcosis." Sabouraudia **23**(3): 225-234.
- Riley, C.B., J.R. Bolton, J.N. Mills and J.B. Thomas (1992). "Cryptococcosis in seven horses." Aust Vet J **69**(6): 135-139.
- Rivera, J., M. Feldmesser, M. Cammer and A. Casadevall (1998). "Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection." Infect Immun **66**(10): 5027-5030.

- Santangelo, R., H. Zoellner, T. Sorrell, C. Wilson, C. Donald, J. Djordjevic, Y. Shounan and L. Wright (2004). "Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model." *Infect Immun* **72**(4): 2229-2239.
- Schop, J. (2007). "Protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection." *Mcgill J Med* **10**(1): 35-43.
- Shao, X., A. Mednick, M. Alvarez, N. van Rooijen, A. Casadevall and D.L. Goldman (2005). "An innate immune system cell is a major determinant of species-related susceptibility differences to fungal pneumonia." *J Immunol* **175**(5): 3244-3251.
- Shoham, S. and S.M. Levitz (2005). "The immune response to fungal infections." *Br J Haematol* **129**(5): 569-582.
- Stano, P., V. Williams, M. Villani, E.S. Cymbalyuk, A. Qureshi, Y. Huang, G. Morace, C. Luberto, S. Tomlinson and M. Del Poeta (2009). "App1: an antiphagocytic protein that binds to complement receptors 3 and 2." *J Immunol* **182**(1): 84-91.
- Steenbergen, J.N. and A. Casadevall (2003). "The origin and maintenance of virulence for the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*." *Microbes Infect* **5**(7): 667-675.
- Steenbergen, J.N., H.A. Shuman and A. Casadevall (2001). "*Cryptococcus neoformans* interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(26): 15245-15250.
- Stephen, C., S. Lester, W. Black, M. Fyfe and S. Raverty (2002). "Multispecies outbreak of cryptococcosis on southern Vancouver Island, British Columbia." *Can Vet J* **43**(10): 792-794.
- Vecchiarelli, A. (2000). "Immunoregulation by capsular components of *Cryptococcus neoformans*." *Med Mycol* **38**(6): 407-417.
- Vecchiarelli, A., D. Pietrella, P. Lupo, F. Bistoni, D.C. McFadden and A. Casadevall (2003). "The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation." *J Leukoc Biol* **74**(3): 370-378.
- Vecchiarelli, A., C. Retini, C. Monari, C. Tascini, F. Bistoni and T.R. Kozel (1996). "Purified capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces interleukin-10 secretion by human monocytes." *Infect Immun* **64**(7): 2846-2849.
- Voelz, K. and R.C. May (2010). "Cryptococcal interactions with the host immune system." *Eukaryot Cell* **9**(6): 835-846.
- Wozniak, K.L., S.E. Hardison, J.K. Kolls and F.L. Wormley (2011). "Role of IL-17A on resolution of pulmonary *C. neoformans* infection." *PLoS One* **6**(2): e17204.
- Wozniak, K.L. and S.M. Levitz (2011). T cell dendritic cell immune responses to *Cryptococcus*. *Cryptococcus from human pathogen to model yeast*. J. Heitman, T. R. Kozel, K. J. Kwon-Chung, J. Perfect and A. Casadevall. Washington D.C., ASM Press: 387.
- Wozniak, K.L., M.L. Young and F.L. Wormley, Jr. (2011). "Protective immunity against experimental pulmonary cryptococcosis in T cell-depleted mice." *Clin Vaccine Immunol* **18**(5): 717-723.
- Zhang, Y., F. Wang, K.C. Tompkins, A. McNamara, A.V. Jain, B.B. Moore, G.B. Toews, G.B. Huffnagle and M.A. Olszewski (2009). "Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99." *Am J Pathol* **175**(6): 2489-2500.
- Zheng, C.F., L.L. Ma, G.J. Jones, M.J. Gill, A.M. Krensky, P. Kubes and C.H. Mody (2007). "Cytotoxic CD4+ T cells use granulysin to kill *Cryptococcus neoformans*, and activation of this pathway is defective in HIV patients." *Blood* **109**(5): 2049-2057.