

UNIVERSITE TOULOUSE III – PAUL SABATIER
U.F.R. des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE TOULOUSE III

**Discipline : IMMUNOPATHOLOGIE, ONCOGENESE ET SIGNALISATION
CELLULAIRE**

Présentée et soutenue par

Céline LAGANE

Le 14 septembre 2007

**ROLE DE L'IL-13 ET DES LIGANDS DE PPAR- γ DANS LA REPONSE
ANTI-INFECTIEUSE DES MACROPHAGES MURINS ET DES MONOCYTES
HUMAINS VIS-A-VIS DE *CANDIDA ALBICANS*.**

IMPLICATION DE PPAR- γ .

Directeur de thèse : Dr. Bernard PIPY

Co-directeur de thèse : Pr. Marie-Denise LINAS

JURY :

Pr. GANGNEUX Jean-Pierre <i>Professeur d'Université Faculté de Médecine, Rennes</i>	Rapporteur
Dr. JACQUOT Jacky <i>Chargé de Recherche INSERM, Paris</i>	Rapporteur
Dr. TOUQUI Lhousseine <i>Directeur de Recherche INSERM, Paris</i>	Rapporteur
Pr. GOURDY Pierre <i>Professeur d'Université Faculté de Médecine, Toulouse</i>	Examineur
Pr. MAGNAVAL Jean-François <i>Professeur d'Université Faculté de Médecine, Toulouse</i>	Examineur
Dr. PIPY Bernard <i>Directeur de recherche INSERM, Toulouse</i>	Examineur

Université Paul Sabatier, EA 2405, IFR31 Institut Louis Bugnard
Polarisation des Macrophages et Récepteurs Nucléaires Dans les Pathologies Inflammatoires et Infectieuses
CHU Rangueil, Bâtiment L1, BP 84 225, 31 432 Toulouse CEDEX 4

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	5
PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	9
1- <i>Candida albicans</i>	11
I. <i>Agent pathogène</i>	12
I.1. Généralités	12
I.2. Organisation cellulaire et moléculaire	14
I.2.1. Structure intracellulaire	14
I.2.2. La paroi	14
I.3. Mécanismes de pathogénicité et facteurs de virulence	17
II. <i>Les Candidoses</i>	18
II.1. Généralités	18
II.2. Aspects cliniques	19
II.2.1. Les candidoses superficielles	19
II.2.2. Le facteur colonisation	20
II.2.3. Les candidoses profondes	21
II.3. Facteurs prédisposant à l'infection candidosique	21
II.3.1. Les facteurs intrinsèques liés à l'hôte	21
II.3.2. Les facteurs extrinsèques et / ou iatrogènes	24
II.4. Les moyens thérapeutiques disponibles	25
II.4.1. Les cibles cellulaires des antifongiques :	25
II.4.2. Les principaux médicaments utilisés et leurs limites :	26
II.4.3. Traitements antifongiques et immunosuppression	27
2- Les mécanismes de défense de l'hôte	29
I- <i>La résistance immunologique innée</i>	30
II- <i>La résistance immunologique acquise</i>	31
II.1. La résistance à médiation humorale anti- <i>Candida</i>	31
II.2. La résistance à médiation cellulaire anti- <i>Candida</i>	31
III- <i>Les monocytes / macrophages dans la lutte anti-Candida</i>	33
III.1. Origine et biologie	33
III.2. L'activation des macrophages	34
III.2.1. L'activation classique	34
III.2.2. L'activation alternative	35
III.3. Les fonctions effectrices des macrophages vis-à-vis de <i>Candida albicans</i>	37
III.3.1. La phagocytose	37
III.3.2. La production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (IROs)	43
III.3.3. La production de monoxyde d'azote (NO)	46
III.3.4. Les cytokines et les médiateurs immunomodulateurs	47
III.3.5. Rôle des eicosanoïdes produits par les macrophages	50
3- Rôle de PPAR γ	53
I. <i>Les récepteurs nucléaires PPARs</i>	54
I.1. Généralités sur les PPARs	54

I.2. Structure des PPARs.....	55
I.3. Hétérodimérisation avec RXR.....	56
I.4. Les mécanismes d'action des PPARs.....	57
I.4.1. Mécanismes de régulation de l'expression des gènes.....	57
I.4.2. Modulation de l'activité transcriptionnelle des PPARs	60
I.4.3. Les cofacteurs.....	62
I.5. Les différents isotopes de PPARs : répartitions tissulaires et rôles	64
I.5.1. PPAR α	64
I.5.2. PPAR β/δ	65
I.5.3. PPAR γ	66
II. Rôle de PPAR γ dans la défense immunitaire.....	70
II.1. Rôle de PPAR γ dans la polarisation des cellules immunitaires	70
II.2. Rôle de PPAR γ dans la réponse anti-infectieuse	70
II.3. Rôles thérapeutiques des ligands de PPAR γ	72
DEUXIEME PARTIE : TRAVAUX DE RECHERCHE	73
1- L'IL-13 atténue une candidose gastro-intestinale chez des souris immunocompétentes ou immunodéprimées RAG-2 ^{-/-} via l'activation de PPAR γ	75
1.1. Introduction.....	76
1.2. Travaux de recherche 1.....	77
1.3. Conclusions et perspectives.....	101
2- L'IL-13 et les ligands de PPAR- γ augmentent les fonctions anti-effectrices des monocytes humains contre <i>Candida albicans</i> mais agissent différemment sur l'expression du récepteur mannose	103
2.1. Introduction.....	104
2.2. Travaux de recherche 2.....	105
2.3. Conclusions et perspectives.....	122
CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES	123
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	131

ABREVIATIONS

AA	Acide Arachidonique
ABCA1	ATP Binding Cassette A-1
AmB	Amphotéricine B
AMPc	Adénosine 3', 5' – monophosphate cyclique
Apo	Adipolipoprotéine
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
COX	CycloOxygénase
CR	Cystein Rich
CTDL	C Type Domain Lectin
DBD	DNA Binding Domain
DC	Dendritic Cell
DC-SIGN	Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin
ER	Estrogen Receptor
FABP	Fatty Acids Binding Protein
FATP	Fatty Acids transport Protein
FFA	Free Fatty Acid
FN	Fibronectin
FT	Facteur de Transcription
FXR	Farnesol X Receptor
GM-CSF	Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor
HDACs	Histone DeACétylases
HDL	High Density Lipoproteins
HETE	Acides HydroxyEicosaTétraEnoïques
HODE	Acides HydroxyOctaDécadiEnoïques
ICAM-1	InterCellular Adhesion Molecule 1
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobulines
IL	Interleukines
IROs	Intermédiaires Réactifs de l'Oxygène
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activative Motif
K	Lysine
LDL	Low Density Lipoprotein
LOX	Lipoxygénase
LPL	Lipases LipoProtéiques
LPS	Lipopolysaccharides
LRRs	Leucin Rich Repeats
LTA	Acide LipoTéicoïque
LXR	Liver X Receptor
M1	Macrophage de type 1
M2	Macrophage de type 2
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MBP	Mannose Binding Protein
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MMP	Métalloprotéinase
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate Hydrogénase
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NF-κB	Facteur Nucléaire kappa B
NHR	Nuclear Hormone Receptor
NK	Natural Killer
NO	Monoxyde d'azote
NOS	NO Synthase
NR	Nuclear Receptor
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PG	Prostaglandines
PGJ ₂	15-déoxy-Δ ^{12,14} -Prostaglandine J ₂

PHOX	PHagocyte OXYdase
PIAS1	Protein Inhibitor of Activated STAT1
PKA	Protéine Kinase A
PKC	Protéine Kinase C
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PLC	Phospholipase C
PPAR	Peroxisome Proliferator-Associated Receptor
PPRE	PPAR Responsive Element
PRR	Pattern Recognition Receptor
RCT	Reverse Cholesterol Transport
RE	Responsive Element
RM	Récepteur Mannose
RXR	Retinoid X Receptor
Saps	Aspartyl protéinases
SIDA	Syndrome de l'Immunodéficience Acquise
SMRT	Silencing Mediator for Retinoid and Thyroid hormone receptors
SOD	Super Oxyde Dismutase
SR-A	Scavenger Receptor class A
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
SUMO	Small Ubiquitin-like MODifier
TF	Facteur Tissulaire
TG	Triglicérides
TLR	Toll-Like Receptor
TPA	12-O-tétradécanoylphorbol-13 acétate
TXA	Thromboxane A
TZD	Thiazolidinediones
VCAM-1	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VDR	Vitamin D Receptor
VEGF	Vascular Endothélial Growth Factor
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humain
VSMC	Vascular Smooth Muscle Cell

Introduction générale

Introduction générale

Candida albicans est une levure qui appartient à la flore commensale des individus sains, mais qui, lorsque le fragile équilibre entre le parasite et l'hôte est rompu, devient opportuniste et colonise les surfaces mucocutanées et les cavités orales et gastro-intestinales de nombreux mammifères. Chez l'homme, cette levure constitue un sérieux problème de santé, notamment chez des patients immunodéprimés et ceux sous thérapies immunosuppressives. En effet, ces dernières affectent les cellules phagocytaires telles que les neutrophiles et les monocytes / macrophages, qui constituent la première et unique ligne de défense de l'hôte immunodéprimé. Dans un tel contexte, les antifongiques présents sur le marché, qui agissent normalement en combinaison avec le système immunitaire, ont une action limitée, bien qu'ils aient prouvé leur efficacité *in vitro*.

Le système immunitaire inné, et notamment l'immunité à médiation cellulaire dont les monocytes / macrophages orchestrent l'action, joue un rôle direct et essentiel dans l'élimination d'un pathogène et la prévention d'une infection. Ainsi, les macrophages participent à la lutte contre *Candida albicans* par leur capacité à phagocyter les levures et à sécréter des agents oxydants toxiques dans le milieu environnant. Ces fonctions des macrophages sont déclenchées lors de la reconnaissance par la cellule de motifs biologiques de structure conservée à la surface des microorganismes (PAMPs, « Pathogen Associated Molecular Patterns ») grâce à des récepteurs de surface appelés PRRs (« Pattern-Recognition Receptors »). Au laboratoire, il a été montré *in vitro* que le récepteur mannose (RM), un PRR clé de l'immunité innée, en reconnaissant des motifs mannose, activait ces fonctions anti-infectieuses des macrophages, conduisant à l'élimination de *Candida albicans*.

Il a aussi été montré *in vitro* que l'expression du récepteur mannose à la surface des macrophages pouvait être modulée par les cytokines Th1 et Th2, induisant respectivement une activation classique ou alternative des macrophages. Ainsi, l'IFN- γ diminue son expression, alors que l'IL-4 ou l'IL-13 l'augmentent et sont associées à la clairance du microorganisme. D'autres substances telles que des lipides bioactifs de la famille des prostaglandines et des drogues de la famille des thiazolidinediones ont prouvé leur efficacité à induire l'expression du RM et l'élimination de *Candida albicans in vitro*. Ces molécules telle que la rosiglitazone, sont des ligands du facteur de transcription PPAR- γ (« Peroxisome-Proliferator Activated Receptor-gamma »).

PPAR- γ est un membre de la famille des récepteurs nucléaires activés par des ligands capable d'induire la transcription de gènes. Au laboratoire, il a été montré que l'induction du RM par les ligands de PPAR- γ mais aussi par l'IL-13 impliquait l'activation de PPAR- γ et conduisait à l'activation des fonctions effectrices anti-*Candida* des macrophages *in vitro*. Ce travail nous a amené d'une part à vérifier la pertinence de ce modèle dans la résolution *in vivo* de pathologies digestives candidosiques sur modèles murins immunocompétents ou immunodéprimés. D'autre part, nous nous sommes attachés à étudier ces mécanismes sur le monocyte humain de sujet sain afin de déterminer si l'augmentation des fonctions anti-infectieuses des macrophages par les cytokines Th2 et les ligands

de PPAR- γ via l'activation de PPAR- γ pouvait constituer un modèle thérapeutique intéressant dans le traitement de candidoses chez l'immunodéprimé.

*La première partie de ce mémoire est consacrée à une revue bibliographique des différents éléments relatifs à notre travail. Le premier chapitre est consacré à l'agent pathogène *Candida albicans* et souligne les problèmes de santé posés par ce champignon chez les patients immunodéprimés ainsi que les limites des traitements actuellement disponibles. Dans un second chapitre, nous décrivons les mécanismes immunitaires mis en place par l'hôte pour se défendre contre l'infection, ainsi que les limites de ces systèmes dans un contexte d'immunodépression. Ce chapitre fait aussi apparaître le rôle des cytokines Th2 et des ligands de PPAR- γ dans la potentialisation des fonctions effectrices des macrophages via l'activation du facteur de transcription PPAR- γ . Enfin, le troisième chapitre est consacré aux effets biologiques des PPARs et au rôle que pourrait jouer PPAR- γ dans la prévention et l'élimination de pathologies infectieuses opportunistes.*

Dans une deuxième partie, nous présentons les résultats de nos travaux de recherche sous la forme d'articles soumis ou en cours de rédaction.

Enfin, dans la dernière partie, nous discutons nos résultats et nous abordons nos perspectives de recherche en continuité de ce travail.

Première partie :
revue
bibliographique

1- *Candida albicans*

I. Agent pathogène

I.1. Généralités

Les levures du genre *Candida* sont la cause de pathologies graves et dont la fréquence reste constante [1] malgré le développement de nouveaux moyens thérapeutiques, en particulier chez des patients immunodéprimés [2].

Parmi le genre *Candida*, 54,3% des infections sont dues à l'espèce *albicans*, 16,4% à l'espèce *glabrata*, 14,9% à l'espèce *parapsilosis*, 8,2% à l'espèce *tropicalis*, et 1,6% l'espèce *krusei* [3]. Il faut toutefois noter que la zone géographique considérée peut fortement influencer la nature de l'espèce retrouvée.

Morphologie

Candida albicans est une levure non capsulée, non pigmentée, et aérobie. Cette levure diploïde, dont le matériel génétique se répartit en huit chromosomes [4], se reproduit de façon asexuée par bourgeonnements multilatéraux d'une cellule mère (le blastospore) [5], formant ainsi des colonies blanches crémeuses.

Au niveau morphologique, cette levure peut mesurer de 3 à 15 μm , et est caractérisée par un polymorphisme que l'on peut retrouver *in vitro* et *in vivo* et qui lui permet de se soustraire aux défenses liées à l'immunité cellulaire. En effet, certains paramètres tels que le pH, la température ou encore la richesse du milieu de culture influencent l'aspect morphologique que peut prendre *Candida albicans* [6]. Ainsi, trois aspects morphologiques peuvent être rencontrés (figure 1) :

- la forme blastospore, ronde ou ovale, mesurant de 2 à 4 μm avec parfois un bourgeon de formation ;
- la forme pseudomycélium, mesurant de 500 à 600 μm de longueur et de 3 à 5 μm de largeur, composée d'un assemblage de cellules mises bout à bout pour simuler un filament mycélien [7, 8]. Chaque compartiment cellulaire est identique en longueur, contient la même quantité de matériel génétique, mais diffère du précédent en quantité de cytoplasme et de ces constituants [9].
- la forme mycélium vrai, champignon filamenteux, spécifique de l'espèce *Candida albicans*, où la conversion d'une levure en filament mycélien passe par l'intermédiaire d'une structure appelée le tube germinatif. Cette forme favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte [10].

Sous certaines conditions environnementales extrêmes en terme de milieu et de température, *Candida albicans* peut aussi former des chlamydozoïdes, qui sont des structures terminales ou latérales arrondies. Elles sont formées par épaissement du thalle, mesurent deux fois la taille du blastospore et possèdent une paroi plus épaisse. Les chlamydozoïdes sont la forme de résistance de *Candida albicans* et participent à l'identification du champignon en laboratoire. Elles sont rarement mises en évidence *in vivo* [11].

Toutes ces transitions morphologiques se mettent en place en réponse à des changements des conditions environnementales, et permettent ainsi au champignon de s'adapter à différentes niches biologiques.

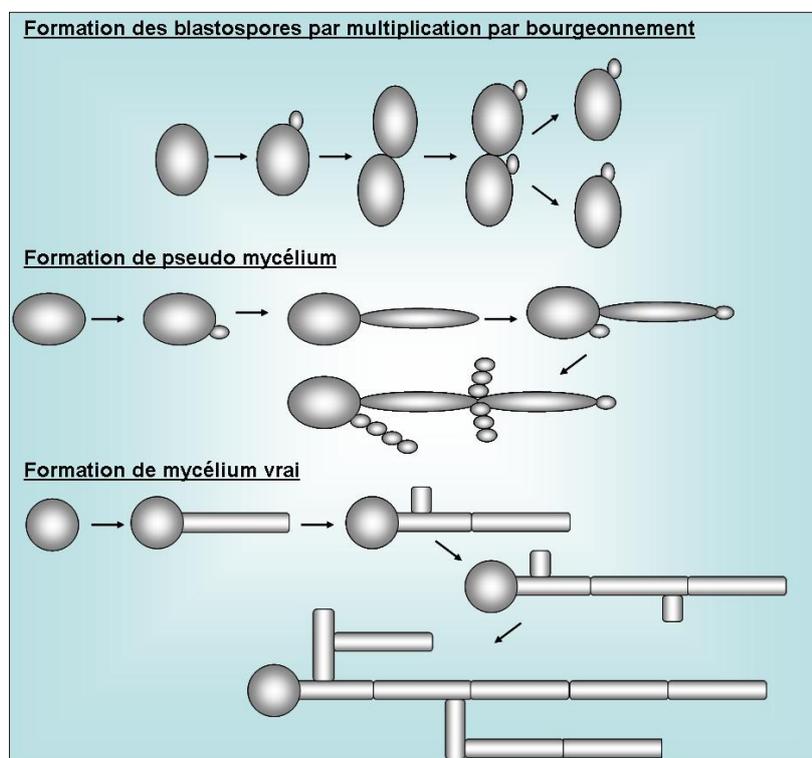


Figure 1 : Morphologie de *Candida albicans*
(d'après Odds, *Candida and Candidosis*, 1988 [12])

Écologie

Candida albicans est considéré chez l'Homme et les animaux à sang chaud comme un commensal des muqueuses, faisant partie intégrante de la flore microbienne [12, 13].

Au niveau des muqueuses digestives et vaginales, la levure se présente sous forme de blastospores, considérées comme la forme saprophyte qui vit en symbiose avec l'organisme hôte. En revanche, lorsque le délicat équilibre entre la forme commensale et les défenses immunitaires est rompu, cette étroite symbiose se transforme en parasitisme, résultant en une maladie infectieuse appelée candidose. Au niveau des tissus infectés, *Candida albicans* est retrouvé simultanément sous les formes de blastospores et de mycéliums. Alors que la forme blastospore reste non-invasive, la forme mycélienne est capable de pénétrer les muqueuses.

Candida albicans est un champignon cosmopolite dont les fréquences d'isolement montrent que chez des sujets sains la levure se répartit différemment en fonction des sites de prélèvement : peau (3%), vagin (13%), tractus ano-rectal (15%), cavité buccale (18%), estomac et duodénum (36%), et jéjunum et iléon (41%). Le réservoir principal est donc le tube digestif où la fréquence de portage varie selon les sujets. Ces résultats sont toutefois à observer avec précaution dans la mesure où les techniques

de prélèvements ne sont pas toujours identiques et les sites de prélèvements ne présentent pas toujours un environnement homogène. Par exemple, les fréquences d'isolement au niveau de la peau sont différentes si l'on s'intéresse aux mains, aux aisselles ou aux cheveux. La contamination est essentiellement inter humaine, soit par transmission fécale, soit par contact direct (salive, sécrétions, mains).

En milieu hospitalier, les levures du genre *Candida* et en particulier *Candida albicans* représentent la cause majeure des infections nosocomiales opportunistes d'origine mycosique. Trois causes ont été identifiées :

- Il semblerait qu'une grande majorité des infections profondes soient d'origine endogène et se développent à partir des levures saprophytes présentes dans le tube digestif de l'hôte et qui traversent la muqueuse. Cependant, il peut aussi exister quelques rares possibilités de colportage par le personnel hospitalier par exemple.
- Une faible proportion des candidoses profondes peut aussi être d'origine exogène à partir d'une colonisation cutanée due au matériel de soins et à la pénétration de cathéters dans l'organisme.
- Enfin, dans de très rares cas, la contamination en milieu hospitalier peut être due à l'environnement du patient (eau, air, alimentation...).

Candida albicans peut aussi être isolé de manière exceptionnelle dans la nature (sol, plante, atmosphère, eau...) mais cela résulte en général d'une contamination fécale.

I.2. Organisation cellulaire et moléculaire

I.2.1. Structure intracellulaire

Candida albicans possède tous les organites intracellulaires caractéristiques des eucaryotes :

- un noyau, délimité par une double membrane nucléaire, et renfermant huit chromosomes [4];
- un nucléole ;
- un réticulum endoplasmique ;
- un appareil de Golgi...

La seule structure différenciant la levure d'une cellule eucaryote « classique » est la présence d'un système vaculo-vésiculaire, évoluant en relation avec le cycle cellulaire et la division [9], et impliqué en majeure partie dans la synthèse de la paroi [14].

I.2.2. La paroi

Initialement, la paroi de *Candida albicans* était considérée comme une structure inerte, assurant la protection et la rigidité du protoplaste. Désormais, il est établi que la paroi est un composant essentiel pour de nombreux aspects biologiques et pathogéniques de *Candida albicans* [15, 16]. La paroi cellulaire agit comme une membrane imperméable et maintient les caractéristiques morphologiques

de la levure. C'est aussi cette paroi, partie la plus externe de la cellule, qui permet les premières interactions physiques entre le microorganisme et son environnement, hôte compris.

80 à 90% de la composition de la paroi de *Candida albicans* est représentée par des carbohydrates [17]. En particulier, 3 constituants basiques représentent la majorité des polysaccharides de la paroi (figure 2) :

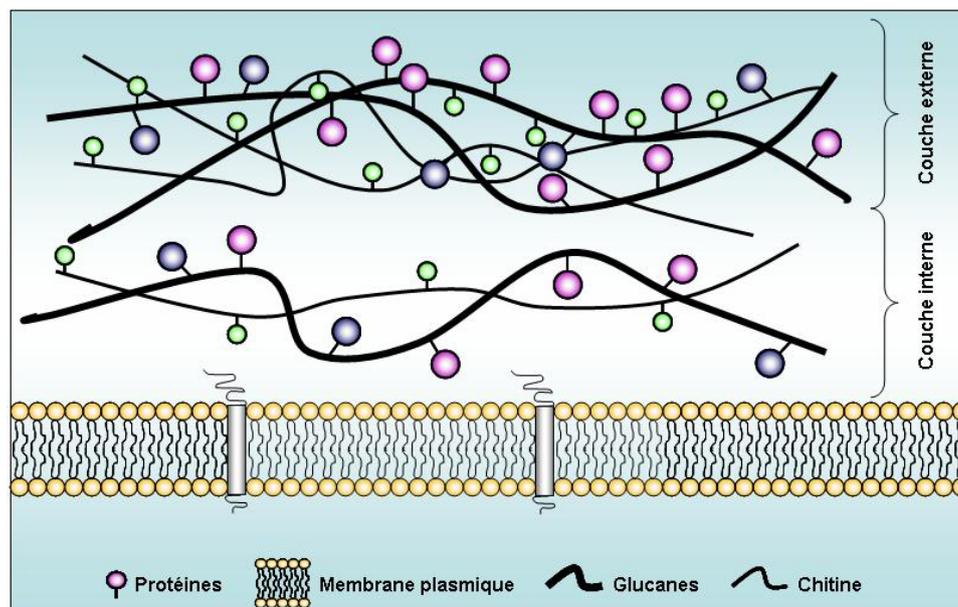


Figure 2 : Organisation moléculaire de la paroi de *Candida albicans*
(d'après Ruiz-Herrera, FEMS Yeast Res, 2006 [16])

- des polymères ramifiés de glucose branchés en α -1,3 et α -1,6 (α -glucanes) [16]. La composition de la paroi en α -glucanes varie en fonction de l'état morphologique de la levure. En effet, elle s'élève à 30-39 % de α -1,3-glucanes pour 43-53 % de α -1,6-glucanes chez les blastospores et les mycélium, alors que ces proportions sont inversées dans le cas des tubes germinatifs [16]. Ces α -glucanes représentent d'un point de vue quantitatif 47 à 60% du poids sec de la paroi. Ce sont donc les constituants majeurs. Ces glucanes constituent la structure de la paroi. Ils forment un squelette rigide, grâce à l'existence de liaisons glycosidiques avec la chitine [18], et procurent de fortes propriétés physiques à la cellule. Les glucanes peuvent être sécrétés dans le sang des patients infectés où ils exercent une toxicité pouvant aller jusqu'au choc anaphylactique chez la souris. De plus, les glucanes de *Candida albicans* peuvent inhiber directement les fonctions des monocytes et celles des cellules T de façon indirecte, ce qui suggère leur rôle prédominant dans le développement de la candidose [19].

- des polymères de mannose (mannanes) associés à des protéines par des liaisons covalentes (glyco[manno]-protéines). Ce sont, avec les α -glucanes, les constituants majeurs de la paroi, puisqu'ils représentent environ 40% des polysaccharides et sont les principaux participants à

la formation de la matrice de la paroi [20, 21]. Le terme « mannane » fait aussi référence au principal composant soluble et immunogène présent dans la couche externe de la paroi, appelé phosphomannoprotéine ou encore phosphopeptidomannane. Cette fraction de la paroi comprend principalement des homopolymères de D-mannose, 3 à 4% de protéines, et 1 à 2% de phosphates. A ce titre, l'organisation générale des mannoprotéines de *Candida albicans* ressemble étroitement à celle de *Saccharomyces cerevisiae* [22]. Les polymères de mannose sont liés à la protéine par un résidu asparagine, thréonine ou sérine.

Les mannanes sont des édifices complexes de masse moléculaire élevée, constitués de résidus mannose liés en α -1,6, α -1,2, α -1,3 [14]. Ces résidus sont reconnus par le récepteur mannose, récepteur de l'immunité innée (PRRs « Pattern Recognition Receptors »), impliqué dans la fixation et la phagocytose de nombreux pathogènes. Les mannanes comprennent également des motifs oligomannosidiques tels que le β -1,2-mannane, qui permet de différencier les sérotypes A et B de *Candida albicans* [16].

Chez l'homme, les mannanes et les glucanes suscitent l'élaboration d'anticorps à des degrés différents chez les sujets sains, les patients colonisés ou infectés [23, 24]. Ainsi, ils confèrent à la paroi des propriétés antigéniques capables d'alerter le système immunitaire de l'hôte.

Cet ensemble moléculaire apparaît comme un facteur de pathogénicité des *Candida* et fait à ce titre l'objet de nombreuses études visant à définir les relations structure / immunoréactivité des oligomannosides qui le constituent [24-26].

- des polymères linéaires de *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) contenant des liaisons α -1,4 (chitine) [16]. La chitine participe, avec les α -glucanes à la composition du squelette de la paroi et est impliquée dans la rigidité de la paroi. Chez les levures, elle participe au processus de bourgeonnement et notamment à la formation de l'anneau de constriction pour la séparation la cellule mère de la cellule fille [27]. La chitine est aussi impliquée dans la formation des septa de la forme mycélienne. Malgré son rôle majeur, c'est un constituant mineur de la paroi (0,6 à 9 %) [28].

- des protéines (6 à 25 %). Certaines interviennent en tant qu'unités structurales au niveau des mannoprotéines. La paroi contient également un certain nombre de protéines ayant une activité enzymatique. En particulier la *N*-acétylglucosamidase, la phosphatase acide, la protéinase, la glucanase et la chitinase [22]. Ces protéines peuvent être sécrétées ou non en fonction du stade de la cellule et de son environnement.

- des lipides (1 à 7%). Ils participent à la rigidité de la cellule. Les lipides majeurs sont les triglycérides, des phospholipides et des stérols libres ou estérifiés. Les phospholipomannanes sont des lipides intéressants, qui interagissent avec les anticorps spécifiques dirigés contre les β -1,2-oligomannosides [29]. Les phospholipomannanes sont déficients en glucosamine, et possèdent leur propre organisation de leur chaîne de glucanes [16]. Il a de même été suggéré que ces composés participeraient aux mécanismes d'adhésion, de protection et de signalisation chez *Candida albicans*.

La composition lipidique est affectée par le passage de la forme blastospore à la forme mycélium [30, 31].

La composition de la paroi des formes blastospores et filamenteuses est quasiment similaire en pourcentage, bien que les quantités relatives de β -glucanes, chitine, et mannanes varient en fonction de la forme de croissance considérée [20]. Ainsi, par exemple, les cellules de l'hyphe contiennent au moins trois fois plus de chitine que les spores.

I.3. Mécanismes de pathogénicité et facteurs de virulence

De façon générale, le rôle infectieux de *Candida albicans*, pathogène opportuniste, semble favorisé par une combinaison de facteurs liés aux statuts immunologique et physiologique de l'hôte, ainsi qu'à des facteurs liés au microorganisme, plutôt qu'à un facteur de virulence unique. Les infections candidosiques sont ainsi probablement initiées par une diminution des défenses de l'hôte qui modifie l'équilibre de commensalisme au profit de la levure, et entraîne le basculement du stade de colonisation à celui de l'infection.

Les infections de la peau et des muqueuses telles que les candidoses vaginales par exemple, sont principalement dues à des modifications du pH et de l'environnement microbien, alors qu'une atteinte systémique est habituellement associée à une insuffisance des défenses de l'hôte, telle que celle présentée par les patients hospitalisés en oncologie soumis à une chimiothérapie ou à une antibiothérapie à large spectre. La séquence des événements qui contribuent à l'installation de *Candida albicans* chez son hôte peut se résumer en trois étapes clés :

- adhérence et colonisation
- invasion au niveau des tissus
- multiplication et survie chez l'hôte

Plusieurs facteurs de virulence ont été proposés :

- L'adhérence aux surfaces : elle peut se faire au niveau des muqueuses, mettant en jeu des interactions spécifiques de type ligand / récepteur avec les mannoprotéines de la paroi de la levure. On parle d'adhésines, telles que celles de la famille de Als1 [32]. L'adhérence peut se faire aussi à partir de la formation de biofilms [33] à l'occasion d'un traumatisme de façon iatrogène ou chirurgicale par l'introduction de matières plastiques telles que les cathéters, les sondes urinaires... De plus, l'hydrophobicité de la paroi du champignon favorise une interaction non spécifique avec les épithéliums. Il a été montré que la nature et le degré de glycosylation des protéines de la paroi altèrent cette hydrophobicité. Ceci pourrait expliquer en partie le fait que certaines souches ou sérotypes de *Candida albicans* soient plus adhérents que d'autres à un type cellulaire donné de l'hôte.
- La formation de mycéliums vrais et de pseudomycéliums : en général, le passage de la forme levure à la forme plus ou moins filamenteuse est associé à la virulence. Les tubes germinatifs, structures intermédiaires entre le blastospore et le mycélium augmentent l'adhérence aux cellules épithéliales et favorisent la colonisation [32] en induisant la propre

endocytose du pathogène [34, 35]. Par la suite, la production d'hyphes augmente l'invasion et la destruction tissulaire [35].

- L'interférence avec la phagocytose : *Candida albicans* est capable de produire des peptides acides pouvant inhiber la liaison aux phagocytes et le métabolisme oxydatif. De plus, la levure peut induire l'apoptose des macrophages et des neutrophiles échappant ainsi aux cellules du système immunitaire [36-38].
- L'interférence avec le complément : les adhésines fongiques (mannoprotéines), apparentées au récepteur CR3 des lymphocytes, peuvent être affines pour certains composants matriciels plasmatiques tels que la fibronectine, mais aussi la fraction C3bi du complément, perturbant ainsi la phagocytose de la levure.
- Les enzymes : la sécrétion d'enzyme hydrolytiques au cours de l'infection favorise la virulence en dégradant les surfaces des muqueuses de l'hôte ainsi que ses défenses immunitaires [39]. Ces enzymes sont des aspartyl protéinases (Saps) [40], des phospholipases [41] et des lipases [42].

II. Les Candidoses

II.1. Généralités

A la fin du siècle dernier s'est développé un nouveau type de pathologie, d'abord restreinte au pays développés : la pathologie « opportuniste ». L'émergence de ces nouvelles maladies a été largement favorisée par les modifications éco-éthologiques des populations, l'évolution rapide des techniques médico-chirurgicales, et l'immunodépression consécutive à l'infection par le VIH et aux nouvelles thérapies immunosuppressives. En effet, ces facteurs facilitent le développement et l'expression du pouvoir pathogène d'organismes saprophytes. Ces dernières années, l'augmentation des infections fongiques montre que c'est au sein de l'embranchement des champignons que se trouvent les micro-organismes potentiellement les plus adaptés à un tel comportement.

Les candidoses, dues aux levures du genre *Candida*, sont les infections opportunistes les plus fréquentes, et leur fréquence a doublé entre les années 80 et 90. En effet, elles représentent désormais plus de 80% des infections à levures. Parmi les candidoses, l'infection par *Candida albicans*, commensal du tractus digestif humain, est la plus commune et représente plus de 60% des levures isolées chez l'homme. Ainsi, *Candida albicans* est responsable d'infections qui, par leur fréquence et leur gravité, se situent au premier rang des infections fongiques [43-46].

Au niveau clinique, les candidoses peuvent être classées en deux groupes :

- les candidoses superficielles
- les candidoses profondes.

II.2. Aspects cliniques

II.2.1. Les candidoses superficielles

Les candidoses superficielles sont les manifestations les plus communes et sont très variées. Elles peuvent atteindre les surfaces épidermiques et les muqueuses telles que la cavité buccale, le pharynx, l'œsophage, les intestins, le système urinaire, et la muqueuse vaginale.

Les candidoses digestives :

Ce sont les affections les plus représentées. C'est au niveau de l'intestin et de l'estomac, les plus importants réservoirs de *Candida albicans*, que se multiplient les levures. Ceci entraîne des troubles digestifs qui peuvent devenir chroniques : aigreurs, douleurs oesophagiennes, douleurs stomacales, diarrhées, constipation, colite intestinale. Parmi les affections digestives on distingue :

- La candidose orale : manifestation la plus fréquente des candidoses, concerne à la fois les sujets non immunodéprimés et les sujets immunodéprimés, avec un caractère de gravité systématique chez ces derniers. L'intérêt porté à cette infection s'est accru ces dernières années, car elle constitue l'une des manifestations orales de l'infection par le VIH, mais elle peut aussi survenir chez des patients leucémiques ou cancéreux ;
- La candidose au niveau de la muqueuse oesophagienne : cliniquement, elle se traduit par une dysphagie douloureuse, un pyrosis et une sensation de brûlure au passage des aliments. L'examen révèle des membranes blanchâtres reposant sur une muqueuse très inflammatoire ;
- La candidose au niveau de la muqueuse gastro-intestinale : elle intéresse tout l'intestin, de l'estomac au colon. Les lésions se présentent comme un muguet intestinal avec des ulcérations. Elle se manifeste par des douleurs abdominales atypiques, des nausées et des vomissements.

La candidose orale et VIH :

Parmi les infections opportunistes du malade VIH⁺, les candidoses oropharyngées sont les plus fréquentes : plus de 80 % des patients VIH⁺ développent une candidose orale à un stade quelconque de la maladie [47]. Elle peut être un signe révélateur de la maladie, être récurrente et s'aggraver par extension à l'œsophage.

En effet, l'intensité de l'effondrement des lymphocytes T CD4⁺ est en relation presque directe avec la forme clinique de la maladie : entre 300 et 700 CD4⁺/mm³ les candidoses uniquement oropharyngées sont les plus fréquentes. En dessous de 100 CD4⁺/mm³, l'oesophagite candidosique apparaît.

Toutefois, la prévalence de ce type de lésions orales a diminué avec l'introduction dans les années 90 de la trithérapie. Ce traitement antirétroviral diminue la répllication virale et augmente le taux de lymphocytes TCD4⁺, entraînant une amélioration de l'immunité et une réduction de l'incidence des infections opportunistes.

Les candidoses uro-génitales :

La vulvo-vaginite est une affection extrêmement fréquente chez la femme. En effet, on estime qu'environ 75% des femmes en activité génitale feront un épisode de candidose vulvo-vaginale. Les

symptômes les plus évocateurs sont l'existence de leucorrhées abondantes blanchâtres, d'aspect granuleux, et d'un prurit vulvaire souvent intense. Le point de départ d'une telle infection reposerait sur un dysfonctionnement hormonal ou immunitaire local. La récurrence de la candidose vulvo-vaginale est un phénomène assez fréquent. Le caractère récidivant des infections candidosiques chez la femme est susceptible d'induire, lors de traitements répétés, des phénomènes de résistance aux traitements passant par l'émergence de souches moins sensibles.

Chez l'homme, l'atteinte génitale par *Candida albicans* est plus rare et correspond à une balanite mycosique ou balanoposthite, qui débute au niveau du sillon balano-prépuce, puis s'étend au gland et au prépuce. L'homme n'est pas porteur sain de la levure au niveau génital. Le développement de ces symptômes cliniques est plutôt secondaire à un rapport sexuel.

Une cystite candidosique peut s'observer essentiellement chez le patient diabétique ainsi que sur des malades porteurs d'une sonde vésicale à demeure. La lésion est localisée au niveau du bassinnet avec la formation d'une boule fongique. Elle s'accompagne d'une inflammation du méat urinaire et d'une urétrite.

Les candidoses cutanées et unguéales :

Ces candidoses des plis se manifestent par un érythème, associé à un enduit crémeux blanchâtre, et sont souvent prurigineuses. Elles sont favorisées par l'obésité, l'humidité et la macération, ainsi que le manque d'hygiène. On distingue classiquement deux grands types :

- l'intertrigo des grands plis : concerne les plis inguinaux, axillaires, abdominaux, sous-mammaires, interfessiers...
- l'intertrigo des petits plis : concerne les plis interdigitaux palmaires, plus rarement les plis interdigitaux plantaires.

Les onyxis et périonyxis candidosiques siègent préférentiellement aux mains. *Candida albicans* pénètre d'abord le bourrelet péri-unguéal et provoque un périonyxis. L'onyxis fait habituellement suite au périonyxis. La contamination se fait le plus souvent à partir d'un réservoir chez l'individu même.

Les candidoses cutanéomuqueuses chroniques :

Ces candidoses sont relativement rares et peuvent toucher des enfants dans les premières années de leur vie. La première infection à *Candida albicans* est généralement bien contrôlée par le système immunitaire de l'hôte. Cependant chez certains patients, dont le système immunitaire est fragilisé, ces infections deviennent récidivantes. Peu à peu, les symptômes deviennent chroniques et les défenses immunitaires trop sollicitées tolèrent désormais un pathogène qu'elles sont incapables d'éliminer. Ces affections chroniques touchent principalement les muqueuses buccales, les ongles et la peau.

II.2.2. Le facteur colonisation

La colonisation préalable du tube digestif à *Candida* est vraisemblablement un des premiers facteurs du développement éventuel d'une infection. Ainsi, le risque de développer une candidose invasive augmente de façon significative dès que plus de deux sites sont colonisés.

L'origine de la colonisation est essentiellement endogène, cependant dans des observations de rechute après traitement antifongique, il a été montré que les souches étaient différentes entre les infections successives, suggérant une infection d'origine exogène. En clinique, la survenue d'épidémies dans des unités à haut risque a suggéré que les levures du genre *Candida* puissent se propager par transmission exogène entre les patients via les professionnels de la santé. On parle alors de contamination croisée. Toutefois, cette contamination croisée semble rare et la responsabilité de cette voie de contamination nosocomiale n'est pas forcément établie.

II.2.3. Les candidoses profondes

Les candidoses profondes, encore appelées systémiques, recouvrent les septicémies à *Candida* et les affections viscérales profondes dont le point de départ est le plus souvent une dissémination hématogène. Rares il y a quelques années, elles surviennent surtout chez des patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs, dans les services de réanimation médicale ainsi que dans les unités d'onco-hématologie. A ce titre, elles occupent désormais le 4^{ème} rang des infections nosocomiales en Europe [48] et aux Etats-Unis [49].

Les septicémies à *Candida albicans* peuvent avoir deux origines :

- une origine endogène à partir d'une infection préexistante au niveau digestif [50, 51]. La dissémination se fait alors par le système porte [52] pour atteindre des organes plus profonds, et notamment le foie, la rate, et plus rarement les poumons.
- Une origine exogène, à partir d'un acte thérapeutique impliquant un traumatisme vasculaire (cathéters, prothèses). Dans ce cas, l'origine de la levure est exogène. Elle va adhérer au cathéter, le coloniser pour former un biofilm [33], puis franchir la voie veineuse pour atteindre des organes tels que la rétine de l'œil, le cœur, le foie et les reins [53-55].

La symptomatologie est aspécifique. Elle se présente habituellement comme une fièvre persistante ne répondant pas à une antibiothérapie antibactérienne à large spectre. L'état est en général dégradé et associé à des douleurs diffuses. Cet état peut entraîner un choc septique conduisant à la mort du patient.

II.3. Facteurs prédisposant à l'infection candidosique

Les candidoses sont des maladies opportunistes profitant de la déstabilisation du fragile équilibre de commensalisme installé entre le parasite et l'hôte pour se disséminer. En cela, certains facteurs, propres ou étrangers à l'hôte, favorisent le développement de la forme invasive.

II.3.1. Les facteurs intrinsèques liés à l'hôte

Les facteurs physiologiques

Age :

Les candidoses orales sont plus fréquentes aux âges extrêmes de la vie.

Les nouveaux-nés sont exposés aux candidoses du fait de la combinaison de l'immatrité de leur système immunitaire associé au développement encore incomplet de leur flore microbienne. La contamination candidosique est le plus souvent d'origine maternelle, lors de l'accouchement.

Chez les personnes âgées en revanche, le facteur de l'âge ne semble pas être le seul impliqué dans la fréquence des candidoses orales. D'autres facteurs sont décrits comme responsables tels que le dysfonctionnement de la motricité oesophagienne, l'appauvrissement des fonctions immunitaires, les anomalies du métabolisme hydrocarboné, les nombreuses associations médicamenteuses, ainsi qu'une mauvaise hygiène buccale liée au port de prothèses dentaires.

Hormones :

La grossesse correspond à une période physiologique durant laquelle le développement des levures est favorisé en raison notamment d'une modification du pH vaginal. Chez la femme enceinte, en particulier au 3^{ème} trimestre de la grossesse, la fréquence des candidoses est 3 à 4 fois plus élevée.

Les facteurs locaux

La macération, l'humidité, l'occlusion, la modification de la trophicité des muqueuses favorisent l'installation et le développement des candidoses superficielles.

Le terrain ou la maladie sous-jacente

Toute maladie affaiblissant les défenses immunitaires de l'hôte est susceptible d'induire le déclenchement d'une candidose. L'immunodéficience peut être due à la maladie (SIDA), ou plus souvent encore, peut être secondaire au traitement mis en œuvre pour obtenir ou consolider la rémission (cancer).

Les cancers

Plusieurs facteurs favorisent l'apparition d'infections opportunistes au cours d'un cancer.

- La maladie elle-même peut provoquer des ulcérations, ouvertures constituant de véritables portes d'entrée dans les épithélia ou dans les muqueuses. C'est le cas dans les cavités non-stériles telles que la bouche, la gorge, les bronches, le tube digestif, les organes génitaux externes... L'ulcération du cancer du côlon peut conduire à une invasion par *Candida albicans* par contact avec les matières fécales porteuses de bactéries et de levures.
- Le cancer des cellules du sang (Leucémie) entraîne une insuffisance de l'immunité cellulaire ou humorale favorisant le développement de maladies opportunistes telle que la candidose.
- Un déficit immunitaire peut aussi être du à la toxicité des traitements mis en œuvre pour lutter contre le cancer. Les progrès accomplis dans le traitement des hémopathies malignes et des cancers sont liés à l'utilisation de traitements de plus en plus intensifs (radiothérapie, chimiothérapie, greffes), affaiblissant les défenses de l'hôte et favorisant le développement de maladies opportunistes telles que la candidose. Ainsi, la neutropénie constitue le principal facteur favorisant au cours d'un cancer ou d'une hémopathie. Les candidoses orales sont très fréquentes chez des patients sous radiothérapie [56]. Les complications associées à ces

traitements se traduisent par des infections fongiques qui représentent la première cause de décès chez ces patients, et qui sont particulièrement redoutées en raison des difficultés de diagnostique.

Le SIDA

Avant la trithérapie, l'incidence des candidoses dues au genre *Candida*, causant principalement des infections orales, a augmenté de façon exponentielle dans les hôpitaux, et notamment chez les patients immunodéprimés atteints du virus du SIDA [57]. Dans les années 1980, le développement de nouveaux traitements antifongiques tels que le fluconazole n'a pas permis de stopper ce phénomène, mais au contraire a favorisé l'émergence de nouvelles souches résistantes [58]. Huit principaux facteurs prédisposants, associés de façon significative à une candidose, ont pu être identifiés à ce jour. Le plus important d'entre eux semble être la pose de cathéters veineux centraux aux malades [57, 59]. *Candida albicans* est le pathogène le plus souvent isolé (48 %) chez les patients VIH⁺ atteints de candidoses, avec un taux de mortalité associé élevé pouvant atteindre 62% [57]. Chez ces patients, les infections orales se poursuivent généralement par une colonisation oesophagienne, puis gastro-intestinale. Dans de rares cas, cette colonisation peut s'étendre à tout l'organisme. Autre atteinte des muqueuses, les candidoses vaginales augmentent considérablement chez les femmes infectées par le VIH. En effet, elles surviendraient chez 24 % des femmes sidéennes [60]. Chez les patients atteints du virus du SIDA, les mycoses à *Candida albicans* sont des infections récurrentes qui ressurgissent le plus souvent dès l'arrêt des traitements.

La mortalité élevée de ces infections dans le SIDA peut aussi s'expliquer par la chute du taux de lymphocytes T CD4⁺. D'autres hypothèses font intervenir, outre l'effondrement de l'immunité à médiation T-cellulaire, des phénomènes immunologiques tels que des anomalies de la fonction macrophagique et des médiateurs cytokiniques. En effet, un déséquilibre du réseau des cytokines fait partie intégrante de l'immunopathologie de l'infection par le VIH. Au cours de l'infection par le virus du SIDA, l'altération de la fonction des cellules T CD4⁺ concerne en particulier la perte de la production de cytokines notamment Th1, cruciales pour le fonctionnement du système immunitaire et impliquées dans la réponse à médiation cellulaire dirigée principalement vers l'élimination des pathogènes. Ainsi, le tableau clinique de patients infectés par le VIH est en accord avec celui de patients présentant un défaut génétique de production de cytokines : ces patients présentent un syndrome d'immunodéficience caractérisé par la présence d'infections opportunistes récurrentes. L'immunité à médiation humorale n'a probablement qu'un rôle accessoire dans les mécanismes de défense au cours d'une infection fongique dans le SIDA. En effet, en général, au cours d'une mycose, il n'existe pas de corrélation entre la présence d'anticorps sériques, le titre de ces anticorps, et le pronostic de l'infection.

Le diabète et les maladies endocriniennes :

La fréquence des patients diabétiques contractant une candidose est très élevée. Ceci peut être expliqué par une très forte glycémie [61-63], une diminution de l'activité des polynucléaires et par une diminution de la salive.

Le syndrome de Cushing, l'hypoparathyroïdie et l'hypothyroïdie sont fréquemment impliqués.

Pathologie cardiaque :

Les valvulopathies et l'introduction de prothèses valvulaires peuvent favoriser le développement de candidoses par adhésion des levures aux plastiques.

La xérostomie :

La xérostomie se définit par une sensation de sécheresse buccale due à une diminution du flux salivaire. La salive remplit deux fonctions essentielles : elle joue un rôle protecteur, assuré par la présence de protéines antimicrobiennes, ainsi qu'un rôle de lavage. Lorsque ces fonctions sont réduites, la fréquence des candidoses orales augmente.

II.3.2. Les facteurs extrinsèques et / ou iatrogènes

Les facteurs alimentaires et la dénutrition

La consommation de glucides en grande quantité semble propice à l'augmentation du saprophytisme intestinal. Certaines carences nutritionnelles, telles que les déficits en fer, sont associées à des candidoses chroniques sans que le mécanisme en soit bien connu.

Par ailleurs, la dénutrition semble être impliquée dans la genèse d'autres facteurs de risque tels que l'inadaptation des prothèses dentaires, la macération due à l'immobilité, les escarres, et c...

Les traitements médicamenteux

Antibiotiques :

La prise d'antibiotiques à large spectre favorise la survenue d'une candidose en altérant la flore bactérienne et en déstabilisant l'équilibre commensal. Ainsi, la modification qualitative et quantitative de ces bactéries commensales des muqueuses, réputées protectrices, favorise la prolifération et par voie de conséquence la pathogénicité des saprophytes du genre *Candida* par exemple. Donc, l'antibiothérapie, surtout si elle est prolongée, peut être à l'origine du déclenchement d'une candidose digestive.

Traitements médicamenteux : immunosuppresseurs et anti-cancéreux :

Des médicaments immunosuppresseurs ou des agents cytotoxiques utilisés en traitement de certains cancers, entraînent des diminutions des défenses immunitaires de l'hôte le prédisposant ainsi au développement de pathologies opportunistes telles que les candidoses.

Ainsi, par exemple, la corticothérapie est un facteur de risque majeur pour les patients leucémiques comme pour les patients transplantés. Ce traitement entraîne une diminution du nombre des cellules mononucléées, une altération des capacités chimiotactiques et cytotoxiques de ces cellules, une réduction de leur migration vers les sites d'infections, et donc une diminution de la phagocytose et de la toxicité vis-à-vis de *Candida albicans*. Par ailleurs, la corticothérapie diminue le nombre de lymphocytes T circulants, sans modifier les lymphocytes B [64].

Traitements chirurgicaux et accès vasculaire

Les cathéters, sondes et matériaux étrangers :

- Les cathéters périphériques ou centraux : les accès vasculaires représentent un facteur de risque majeur de candidose [57, 58].
- Les sondes peuvent aussi être responsables de candidoses par effraction des muqueuses. Par exemple, une sonde urinaire peut constituer un réservoir de *Candida* en raison de l'adhérence des levures aux matériaux, entraînant la formation de biofilms [33].
- Les prothèses dentaires, valvulaires ou encore orthopédiques constituent des foyers à risque.

Le traitement chirurgical :

Parmi les chirurgies à risque, citons la chirurgie digestive, ainsi que celles qui sont accompagnées d'immunosuppression transitoire.

II.4. Les moyens thérapeutiques disponibles

Les antifongiques sont des molécules capables de détruire spécifiquement les différents champignons impliqués en mycologie médicale, ou au moins de réduire leur prolifération. Contrairement au grand nombre d'antibiotiques et malgré d'importants progrès, la quantité d'antifongiques disponibles reste limitée à un petit nombre de produits. En effet, il n'existe à ce jour que quatre classes d'antifongiques (les polyènes, les dérivés pyrimidiques, les dérivés azolés et les échinocandines), et celles-ci connaissent des facteurs limitant leur utilisation.

II.4.1. Les cibles cellulaires des antifongiques :

- L'ergostérol membranaire : la membrane plasmique de la levure est constituée d'une bicouche lipidique incrustée de protéines. Cette membrane joue le rôle de barrière entre le microorganisme et l'extérieur, tout en permettant les échanges. L'ergostérol est un constituant essentiel nécessaire au maintien de la structure. L'activité fongique des dérivés azolés repose sur l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol, empêchant la constitution d'une membrane plasmique fonctionnelle. Les polyènes, tels que l'Amphotéricine B (AmB), quant à eux, interagissent directement avec ce constituant membranaire. Cette interaction forme des pores perméables dans la membrane de la levure.
- La paroi cellulaire fongique : c'est la cible privilégiée des échinocandines. Elles inhibent la biosynthèse des glucanes de la paroi par l'inhibition de la β -1,3-glucane synthétase. Cela entraîne l'arrêt de la synthèse de la paroi cellulaire (effet fongistatique), suivi de sa destruction (effet fongicide).
- Le métabolisme pyrimidique : certains antifongiques tels que les dérivés pyrimidiques peuvent inhiber la biosynthèse d'ADN ou encore interférer avec la traduction des ARNm en protéines fongiques.

II.4.2. Les principaux médicaments utilisés et leurs limites :

II.4.2.1. Les polyènes

Le plus connu des polyènes est l'Amphotéricine B (AmB), utilisée depuis 1960 comme le chef de file des antifongiques [65]. Il s'agit d'un polyène macrolide, produit naturel de *Streptomyces nodusus*. L'AmB comprend une chaîne polyhydroxylée hydrophile, associée à une chaîne polyène lipophile. Molécule amphiphile, elle possède une grande affinité pour l'ergostérol membranaire. Le mode d'action communément admis est la formation de complexes stérols-AmB insolubles, qui entraînent un réarrangement moléculaire au niveau de la membrane de la levure. Ainsi, il en résulte une altération de la perméabilité cellulaire, avec fuite de métabolites essentiels à la vie du champignon, et pénétration de sodium avec œdème cellulaire.

L'AmB est insoluble dans l'eau et non absorbable par voie orale. Elle est donc administrée par voie veineuse. Son spectre d'activité reste large : il inclut les levures, les champignons filamenteux et les champignons dimorphiques.

Les effets indésirables habituels sont peu dangereux, mais rendent le traitement inconfortable (céphalées, fièvres, troubles digestifs...). Parfois, des réactions allergiques rares peuvent mener au choc anaphylactique. Toutefois, l'AmB présente une toxicité élevée [66], notamment d'ordre rénal. Ainsi, au cours d'un traitement prolongé on voit apparaître des lésions chroniques localisées au niveau du tubule pouvant aboutir à une insuffisance rénale [67]. Elle nécessite une adaptation posologique et une surveillance régulière de la fonction rénale. Une toxicité veineuse quasi permanente est constatée, les toxicités hématologique, hépatique et neurologique sont rapportées de façon plus exceptionnelle.

De nouvelles formes galéniques d'AmB vectorisées par des lipides ont été développées. Sous formulation lipidique, la néphrotoxicité est amoindrie en raison d'une interaction mineure avec les cellules de l'hôte [68-70], et il semblerait que l'efficacité de cette formulation soit supérieure à la précédente [65]. D'autres formulations sont en cours d'étude, notamment une combinaison de l'AmB avec un tétrapeptide immunomodulateur (tuftsin), capable d'augmenter les fonctions immunitaires des macrophages, des neutrophiles et des monocytes, et qui a déjà fait ses preuves *in vivo* chez un modèle murin [71].

II.4.2.2. Les dérivés azolés

Les dérivés azolés sont des substances synthétiques ayant un noyau azolé contenant soit deux soit trois atomes d'azote (imidazole et triazole respectivement). La tolérance de ces traitements reste bonne, avec seulement quelques troubles digestifs et de rares réactions cutanées. Leur toxicité est surtout hépatique, avec une élévation du taux des transaminases. Les dérivés imidazolés sont de nos jours clairement remplacés par les triazolés tels que le fluconazole ou le voriconazole.

Avec l'AmB, les mutations vers la résistance, spontanées ou sous traitement, restent exceptionnelles et négligeables en pratique. En revanche, chez les dérivés azolés, et chez les triazolés tels que le fluconazole ou le voriconazole, on voit apparaître après traitement des souches de *Candida* résistantes à ces produits, comme notamment *Candida glabrata* [72, 73].

II.4.2.3. Les dérivés pyrimidiques

Le plus connu d'entre eux est la 5-fluorocytosine (5-FC). Il s'agit d'un dérivé fluoré de la pyrimidine, substance hautement soluble dans l'eau, qui peut être administrée par voie orale ou veineuse.

En clinique, la 5-FC a jusqu'alors été communément utilisée en combinaison avec l'AmB afin d'obtenir une interaction synergique plus efficace pour lutter contre les infections fongiques. Or, il semblerait que cette combinaison ait entraîné la minimisation de la détection de l'émergence de phénomènes de résistance associés à l'utilisation de la 5-FC. Ce problème de résistance, associé à l'utilisation de la 5-FC en monothérapie, a récemment pu être mis en évidence dans plusieurs études [74, 75].

Outre des troubles digestifs, la 5-FC est associée à une toxicité hépatique et hématologique.

II.4.2.4. Les échinocandines

Le plus connu est la caspofungine. Les échinocandines sont des lipopeptides amphiphiles semisynthétiques, comprenant un noyau hexapeptide cyclique et une chaîne latérale lipidique. La caspofungine est soluble dans l'eau et non absorbée par voie orale, mais injectée par voie veineuse.

Il ne semble pas exister de toxicité dose-limitante pour la caspofungine.

II.4.3. Traitements antifongiques et immunosuppression

Le traitement des candidoses est souvent difficile chez les immunodéprimés en raison de l'absence de produit réellement fongicide dans un contexte de déficit immunitaire profond. Ainsi, aucun produit actuellement disponible sur le marché n'est fongicide *in vivo*, qualité essentielle dans le développement des mycoses chez l'immunodéprimé.

Ainsi, le SIDA a fortement modifié le tableau clinique des infections fongiques. La fréquence des récurrences, liée à l'arrêt du traitement en l'absence d'éradication du champignon causal pose le problème du traitement prophylactique de ces récurrences, avec les risques d'inconfort pour le malade et le risque toujours présent de sélectionner des souches résistantes [76].

Chez les patients VIH⁺, trois facteurs semblent gêner l'efficacité des antifongiques disponibles :

- L'absence des fonctions effectrices qui coopèrent avec l'antifongique pour lutter contre le pathogène [77, 78].
- La résistance des levures aux dérivés azolés [73].
- La toxicité des antifongiques tels que l'AmB [66, 67].

Il en est de même chez les patients d'hémo-oncologie en raison du déficit immunitaire sous-jacent. Bien souvent, ça n'est qu'au moment de la rémission hématologique ou lors de la récupération d'un nombre normal de polynucléaires neutrophiles que l'efficacité optimale du traitement antifongique est constatée.

Ainsi, le traitement de mycoses invasives par les antifongiques habituellement utilisés peut, dans le cas de patients sévèrement immunodéprimés, avoir une efficacité très limitée. C'est pourquoi de nouvelles stratégies thérapeutiques, consistant à restaurer ou à intensifier les défenses de l'hôte ont été développées.

Le rôle régulateur des cytokines sur les fonctions effectrices des macrophages permet d'envisager d'associer une immunothérapie aux traitements antifongiques usuels. Des études ont ainsi montré que l'association d'antifongiques tels que l'AmB ou le fluconazole avec des cytokines Th1, potentialise l'effet de ces traitements [79, 80]. Ainsi, les cytokines et les antifongiques semblent agir en synergie pour s'opposer à la croissance des champignons via l'activation des cellules effectrices. Ces résultats soulignent l'intérêt de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans le traitement des mycoses en associant une immunothérapie aux traitements antifongiques usuels.

2- Les mécanismes de défense de l'hôte

La première ligne de défense de l'hôte contre les agressions pathogènes est constituée par la barrière cutanéomuqueuse. La rupture physique de ce revêtement, par une plaie chirurgicale ou accidentelle, par intrusion d'un cathéter, par brûlure ou mucite induites par des agents cytotoxiques, est la porte d'entrée à une colonisation fongique à partir de *Candida albicans* saprophyte de la peau ou des muqueuses. Une fois le pathogène entré, les mécanismes de défense de l'hôte reposent sur une coopération étroite entre l'immunité innée et l'immunité adaptative [81], dont la contribution relative varie en fonction du site d'infection.

I- La résistance immunologique innée

Il est prouvé que des anomalies de la résistance immunitaire innée prédisposent au développement de pathologies opportunistes. Le rôle de l'immunité innée est de limiter rapidement l'infection, grâce à des mécanismes effecteurs tels que la phagocytose des agents pathogènes, médiée par les macrophages, les neutrophiles et les éosinophiles. Ces cellules sont capables de phagocyter *Candida albicans* soit sous forme opsonisée via les récepteurs Fc ou au complément soit directement sans opsonisation préalable de la levure.

L'efficacité de la phagocytose des levures non opsonisées repose aussi sur une grande capacité des phagocytes à discriminer entre les antigènes du soi et du non-soi. En effet, les pathogènes exposent à leur surface une multitude de motifs de structures biochimique et moléculaire conservées, reconnus par l'hôte grâce à un système de récepteurs particuliers : les PRRs (Pattern-Recognition Receptors) [81]. Par exemple, les mannanes de la paroi de *Candida albicans* sont reconnus par le récepteur mannose (RM) des macrophages, un récepteur de la famille des lectines de type C, qui entraîne la phagocytose de l'agent pathogène [82]. Dans le macrophage, la levure est tuée et dégradée dans le phagosome, puis présentée sous forme de peptides antigéniques, complexés à une molécule de complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), aux cellules T, déclenchant ainsi l'activation de l'immunité adaptative [83].

L'immunité innée joue un rôle primordial dans la résolution d'infections touchant en particulier les muqueuses. A ce titre, d'autres types cellulaires contribuent à la défense de l'hôte, tels que les neutrophiles, les cellules NK (Natural Killer), les cellules dendritiques (DC), les lymphocytes T $\gamma\delta$, et certaines cellules non hématopoïétiques telles que les cellules épithéliales des muqueuses. D'autres facteurs de premier plan, tels que les collectines (MBP, Mannan Binding Protein), ainsi que toute une batterie de peptides antimicrobiens entrent aussi en jeu pour combattre l'infection [81].

Outre l'attaque directe des agents pathogènes, l'immunité innée est aussi capable d'entraîner la sécrétion de molécules favorisant le chimiotactisme, la prolifération des cellules immunitaires, et la différenciation terminale de cellules aussi bien de l'immunité innée que de l'immunité adaptative, *via* la synthèse de cytokines [84].

Mais si l'activation de l'immunité innée reste efficace pour limiter la prolifération de *Candida albicans*, seule elle est bien souvent insuffisante à éliminer l'agent pathogène en question.

II- La résistance immunologique acquise

II.1. La résistance à médiation humorale anti-*Candida*

L'immunité à médiation T-cellulaire ainsi que l'immunité innée (macrophages, neutrophiles) ont toujours été considérées comme les plus efficaces pour lutter contre une candidose. Toutefois, bien que le rôle de l'immunité humorale médiée par les anticorps ait toujours été controversée, ces dernières années des travaux ont pu démontrer que ces anticorps anti-*Candida* pouvaient quand même jouer un rôle dans le contrôle d'une infection des muqueuses ou systémique [85], protégeant l'hôte durant l'infection [86]. Les anticorps anti-*Candida* sont en grande majorité des IgG, mais on peut parfois trouver des IgA, notamment au niveau des muqueuses [87].

Les mécanismes exacts par lesquels ces anticorps protègent l'hôte de l'infection par *Candida albicans* sont encore mal connus, mais il semblerait que ces anticorps permettraient l'inhibition de l'adhésion des blastospores, l'inhibition de la formation du tube germinatif, l'opsonisation des pathogènes, ainsi que la neutralisation des facteurs de virulence sécrétés par la levure telles que des enzymes [86].

Si l'inhibition des mécanismes d'adhésion de *Candida albicans* aux surfaces de l'hôte est la propriété humorale la plus documentée, il a aussi été rapporté que des anticorps pouvaient jouer un rôle dans le contrôle direct de la multiplication du pathogène. Le rôle bénéfique d'anticorps dirigés contre les facteurs de virulence de la levure (enzymes) ou contre les constituants même de la paroi cellulaire a aussi été démontré.

II.2. La résistance à médiation cellulaire anti-*Candida*

Il est clairement démontré que la résistance à *Candida albicans* est basée essentiellement sur une immunité à médiation cellulaire, où les macrophages et les cellules T jouent un rôle primordial, dans des proportions qui dépendent du site d'infection considéré [84]. Les cytokines produites par les macrophages, premières cellules recrutées au cours d'une infection, entraînent une différenciation des lymphocytes T qui transitent entre l'état Th0 (non activé) et Th1 ou Th2, conditionnant leurs caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles. En retour, ces lymphocytes vont produire des cytokines particulières qui vont activer des cellules phagocytaires et des cellules B sécrétrices d'anticorps.

Au cours d'une infection par *Candida albicans*, il est généralement accepté que les événements menant à la protection de l'hôte sont associés à une réponse dominante de type Th1, médiée par des cytokines telles que l'interleukine-12 (IL-12) et l'interféron-gamma (IFN- γ) [88]. Ces cytokines sont impliquées dans l'activation des fonctions microbicides des cellules de l'immunité innée (sécrétion d'agents oxydants, dégranulation), et favorisent aussi la production d'anticorps anti-*Candida* [87]. Au contraire, une réponse de type Th2 est associée à l'augmentation de la sévérité de la maladie.

L'importance de l'immunité à médiation T-cellulaire est illustrée par la prévalence des infections orales chez les sujets dont les taux de T CD4⁺ systémiques sont inférieurs à 200 cellules / μ l de sang [89]. En effet, en dessous de ce seuil, seules les défenses locales des muqueuses sont impliquées dans la défense anti-*Candida*. Le rôle important des lymphocytes T est aussi souligné par le fait que des

souris déficientes en CD4⁺ sont prédisposées à développer des candidoses chroniques, résolues lors d'une reconstitution de ces souris par transfert adoptif avec une population de T CD4⁺ naïfs [90]. Cette rémission s'accompagne d'une forte sécrétion d'IL-12 au niveau des noeuds lymphatiques [90]. En effet, chez ces animaux, les cellules phagocytaires seules ne semblent pas suffisantes pour résoudre l'infection. Il est donc possible que lors d'une candidose orale chez la souris, ces cellules T CD4⁺ soient requises pour produire des agents chimiotactiques et des cytokines activatrices des cellules phagocytaires telles que les macrophages pour une résolution efficace de l'infection [84]. Par contre, dans le cas d'une candidose oropharyngée murine, il a été montré par déplétion respectivement que les macrophages et les neutrophiles agissent de façon synergique dans le but d'éliminer l'agent pathogène [90].

Le rôle des lymphocytes T CD8⁺ dans la résolution de la pathologie reste quant à lui inconnu. En revanche, il a été observé que leur nombre était augmenté chez les patients VIH⁺ développant une candidose orale, et chez lesquels les taux de lymphocytes T CD4⁺ étaient inférieurs à 200 cellules / μ l [91].

Les cellules NK semblent jouer un rôle central dans l'immunité anti-*Candida*, en délivrant des signaux activateurs aux autres cellules immunitaires via la sécrétion de cytokines. Bien que ces cellules soient incapables de détruire directement *Candida albicans in vitro*, il a été montré qu'elles pouvaient se substituer aux cellules T en induisant l'activation des cellules phagocytaires et ainsi protéger l'animal d'une infection létale [92].

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules dérivées de la moelle osseuse qui peuvent avoir une origine myéloïde ou lymphoïde, et qui se situent soit dans les organes lymphoïdes tels que le thymus, la rate et les noeuds lymphatiques, soit dans des tissus et des organes non-lymphoïdes. Les DC jouent le rôle de cellules présentatrices d'antigènes et constituent ainsi un lien très important entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Les DC immatures capturent l'antigène dans les tissus en périphérie, puis mûrissent et migrent vers les organes lymphoïdes où elles vont activer les cellules T. La maturation des DC est caractérisée par une diminution de la capture des antigènes, une augmentation des molécules de CMH et de co-stimulation, une augmentation de la production d'IL-12 et une diminution de l'expression de récepteurs aux chimiokines [93-96].

Les DC expriment différents PRRs et, en fonction du pathogène rencontré, vont orienter la réponse T vers un profil Th1 ou Th2, ou encore vers un profil Th3 régulateur [97, 98]. Au cours de l'infection par *Candida albicans*, une réponse de type Th1 est associée à l'élimination de l'infection alors qu'une réponse Th2 semble être associée au développement de la pathologie [99]. Cette orientation différente, responsable de l'évolution favorable ou non de la maladie, est en partie dépendante des DC.

Chez l'Homme, il a été montré que les DC immatures peuvent phagocyter *Candida albicans* via le récepteur mannose [100]. Les levures ainsi internalisées sont lysées, présentées à la surface des DC et déclenchent une prolifération des cellules T anti-*Candida* [100-104]. Chez la souris, il a été montré

que la morphologie de *Candida albicans* affectait les DC et la réponse immunitaire. En effet, la forme blastospore induit la production d'IL-12 par les DC et le développement d'une réponse Th1, alors que la forme filamenteuse inhibe cette dernière et conduit au développement d'une réponse Th2 avec sécrétion d'IL-4 par les DC [105].

III- Les monocytes / macrophages dans la lutte anti-*Candida*

III.1. Origine et biologie

Les monocytes / macrophages appartiennent au système des phagocytes mononucléés [106]. Ils sont originaires des cellules pluripotentes localisées dans la moelle osseuse [106-108], qui se différencient successivement en monoblastes, promonocytes puis monocytes médullaires. Les monocytes nouvellement formés migrent alors dans la circulation sanguine où ils représentent 4 à 6 % des leucocytes. Cette différenciation est rapide et médiée par l'IL-3, puis le GM-CSF et le M-CSF. Elle permet le développement de leurs propriétés de phagocytose, de migration et de chimiotactisme, ainsi que l'expression des récepteurs Fc des immunoglobulines et du facteur C3 du complément. Dans des conditions normales, les monocytes ne séjournent que 24h dans le sang circulant. Grâce à leur capacité de diapédèse, les monocytes peuvent franchir la barrière endothéliale des vaisseaux sanguins et pénétrer ensuite dans les différents tissus de l'organisme, ce qui conditionne leur différenciation en macrophages résidants [109]. Les macrophages sont présents dans de nombreux organes et tissus comme le foie (cellule de Kupffer), la rate (macrophages spléniques), les poumons (macrophages alvéolaires), le péritoine (macrophages péritonéaux), le tissu conjonctif (histiocytes), la peau (cellules de Langerhans), le cerveau (astrocytes), l'os (ostéoclastes), la synovie et le thymus (figure 3).

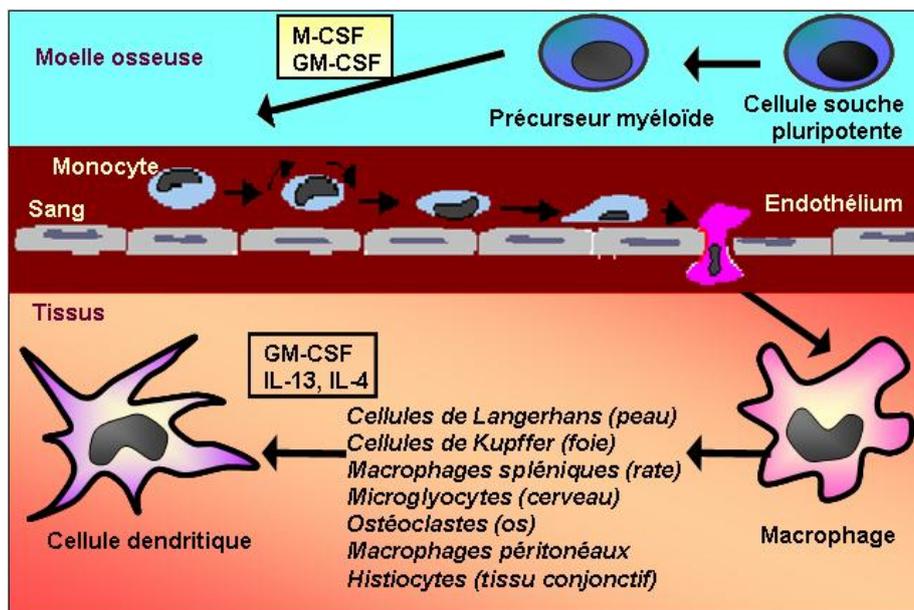


Figure 3 : Différenciation des monocytes en macrophages et répartition tissulaire

Il existe peu de différences immunophénotypiques entre les monocytes circulants et les macrophages. La principale est l'expression du CD68 par les macrophages, molécule intracellulaire associée à la phagocytose. En revanche, des différences morphologiques sont à noter. Le macrophage est de plus grande taille que le monocyte (20 à 50 μm contre 12 à 15 μm), le rapport noyau / cytoplasme est diminué, la composition en organites intracellulaires est enrichie, tout comme la teneur en ARN. Le noyau se dote d'un volumineux nucléole, et on note la présence de vacuoles de phagocytose. Le nombre de récepteurs de surface augmente, tout comme la synthèse de certaines enzymes.

Les monocytes / macrophages constituent une famille de cellules ayant un phénotype très hétérogène. Cette hétérogénéité résulte de leur large distribution tissulaire ainsi que de leur réactivité à de nombreux stimuli endogènes et exogènes auxquels ils sont soumis. Ces stimuli sont reconnus par de nombreux récepteurs membranaires déclenchant des signaux cellulaires ainsi que des changements complexes au niveau de l'expression des gènes. Cette hétérogénéité phénotypique se répercute dans la diversité de leurs fonctions.

Ainsi, de nombreux auteurs se sont attachés à définir le concept d'activation des macrophages, en fonction de la nature de l'agent activateur et des gènes et fonctions exprimés en réponse à cette activation.

III.2. L'activation des macrophages

En réponse à des stimuli tels que des cytokines ou encore des agents pathogènes comme *Candida albicans*, les macrophages expriment des propriétés fonctionnelles spécialisées différentes [110, 111]. Calqué sur la nomenclature des profils d'activation Th1 / Th2 des lymphocytes T, le concept de polarisation des macrophages de type M1 / M2 a émergé (figure 4).

III.2.1. L'activation classique

Les macrophages M1, activés classiquement, sont polarisés en réponse à l'IFN- γ produite par les cellules T, seul ou en combinaison avec des stimuli microbiens (LPS par exemple) ou avec d'autres cytokines telles que l'IL-12, l'IL-18 [110], le TNF- α et le GM-CSF [112]. En général, les macrophages M1 expriment un phénotype IL-12^{high}, IL-23^{high} et IL-10^{low}. De même, ils sont capables de produire une grande quantité de molécules effectrices (intermédiaires réactifs de l'oxygène et du nitrogène) et de cytokines inflammatoires (IL-1 β , TNF- α , IL-6). Les macrophages M1 sécrètent des chimiokines et expriment leurs récepteurs tels que IP-10 (CXCL10), MIG (CXCL9) et CXCL11 en réponse à l'IFN- γ [113]. Ils participent à la polarisation de la réponse immunitaire Th1, et combattent les parasites intracellulaires et les tumeurs [112]. Ils favorisent donc une immunité à médiation cellulaire et sont responsables de dommages tissulaires (figure 5).

Au cours de l'infection à *Candida albicans*, il est généralement admis que la réponse immunitaire passe par une activation classique dans laquelle l'IL-12 et l'IFN- γ jouent un rôle clé dans l'activation des macrophages vers un profil de type M1. Cependant, depuis quelques années, un nouveau concept d'activation des macrophages a émergé : c'est l'activation alternative.

III.2.2. L'activation alternative

Il a été montré que l'IL-4 et l'IL-13, produites par les cellules T, non seulement inhibent l'activation classique des macrophages, mais favorisent le développement d'une forme alternative d'activation [114]. Sont classées sous le terme M2 toutes les formes d'activation qui ne sont pas M1, c'est à dire l'activation par l'IL-4 ou l'IL-13, mais aussi par les complexes immuns (pathogènes opsonisés), l'IL-10, les glucocorticoïdes ou encore les hormones stéroïdes [110, 111]. Ainsi, parmi les macrophages polarisés M2, on peut distinguer différentes sous classes en fonction de la substance activatrice. Ainsi, on parle d'activation alternative M2a lorsque le macrophage est activé par l'IL-4 ou par l'IL-13. Cette activation conditionne l'expression de récepteurs de l'immunité innée comme le récepteur mannose [115] ou des récepteurs scavenger de classe B comme le CD36 [116]. Ces récepteurs facilitent l'élimination respective de *Candida albicans* ou des érythrocytes parasités par *Plasmodium falciparum*. En revanche, on parle d'activation alternative M2b lorsque le macrophage est activé par les complexes immuns et M2c lorsqu'il est polarisé par l'IL-10.

Récemment, il a aussi été décrit que l'activine A, membre de la famille du TGF- β , et l'IL-21 induisaient de la même façon une activation alternative des macrophages [117-120].

Les différentes formes de macrophages M2 expriment un phénotype IL-12^{low}, IL-23^{low}, IL-10^{high}, et produisent un antagoniste du récepteur à l'IL-1, (IL-1ra). Généralement, les macrophages M2 expriment fortement des molécules de surfaces telles que le récepteur mannose, le récepteur Dectine-1, le CD23, des molécules du CMH de classe II, et des récepteurs scavenger tels que le CD36. Dans ces cellules, le métabolisme de l'arginine bascule au profit de la production d'ornithine et de polyamines [112]. Récemment, FIZZ-1 et Ym-1 ont été identifiés comme de nouveaux marqueurs d'activation M2, induits *in vitro* et *in vivo* par l'IL-4, et inhibés par l'IFN- γ *in vitro* [121, 122]. Une molécule relativement proche de Ym-1, nommée Ym-2, est induite dans le macrophage alvéolaire en réponse à l'IL-13 au cours d'une allergie pulmonaire [123]. Les macrophages M2 sécrètent aussi des chimiokines et expriment leurs récepteurs, tels que l'éotaxine-2 (CCL24), CCL17 et MDC (CCL22) en réponse à l'IL-4 [113] (figure 4).

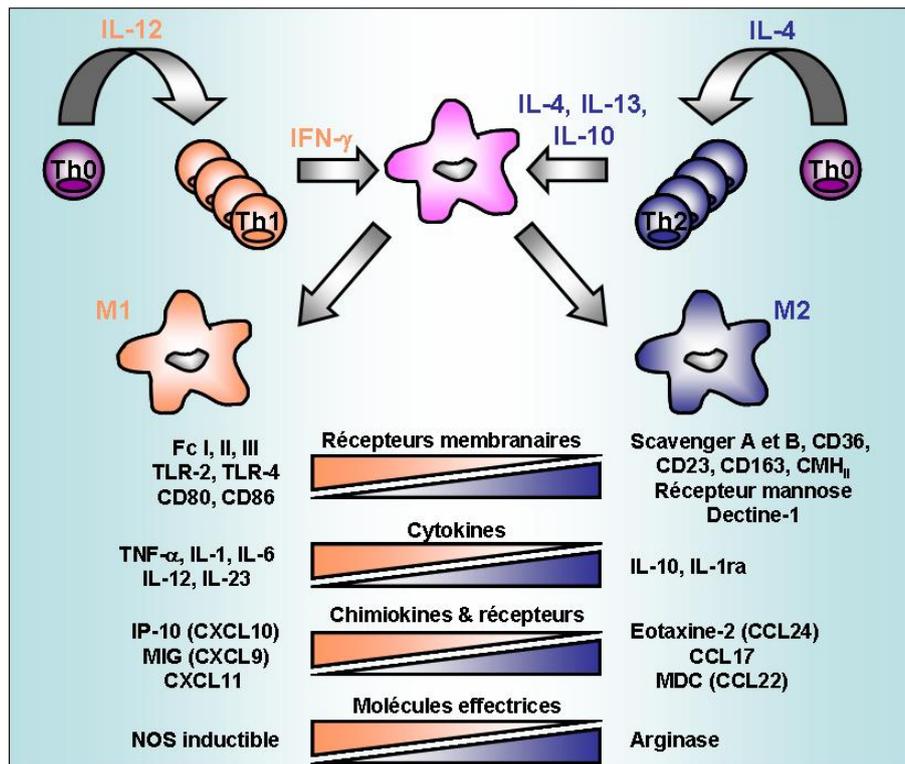


Figure 4 : Polarisation M1 / M2 des macrophages

Outre leurs rôles dans la réparation tissulaire [124], dans la réparation du système nerveux, dans l'athérosclérose, dans la tolérance fœtale, et dans les tumeurs, les macrophages M2 contribuent à la mise en place d'une immunité à médiation humorale, et favorisent les réactions allergiques et anti-parasitaires [110, 125] (figure 5). Au laboratoire, nous avons montré que les macrophages M2 activés par l'IL-4 ou l'IL-13 possèdent des propriétés anti-*Candida* potentialisées favorisant l'élimination de cet agent pathogène.

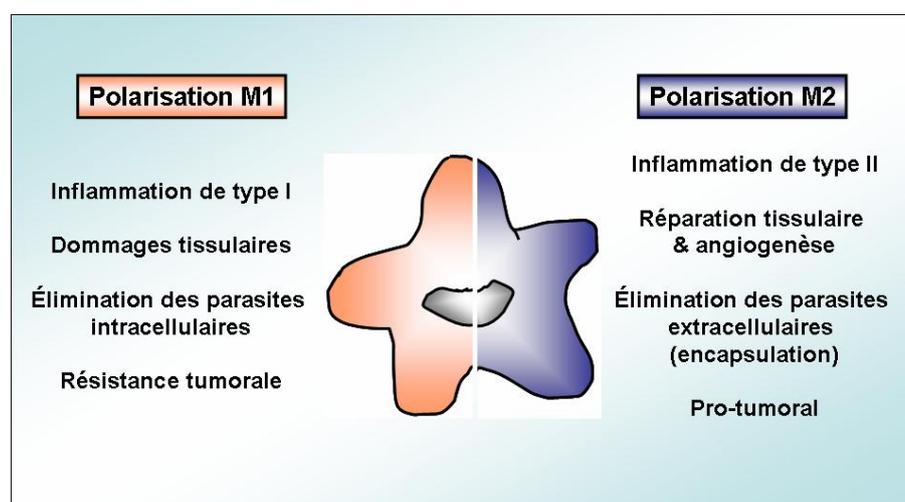


Figure 5 : Fonctions des macrophages polarisés M1 / M2

(d'après Mantovani, Eur J Immunol, 2007 [112])

III.3. Les fonctions effectrices des macrophages vis-à-vis de *Candida albicans*

Globalement, les monocytes / macrophages interviennent dans l'homéostasie de l'organisme. Ils constituent la première ligne de défense contre les agents étrangers et interviennent dans la destruction des cellules tumorales et des cellules sénescents. Ils sont impliqués dans la réponse immune innée par leur capacité à reconnaître et éliminer les particules étrangères par la phagocytose. Ils participent également à la réponse immune spécifique adaptative par leur capacité à présenter les particules antigéniques associées au CMH aux lymphocytes T, et à sécréter des médiateurs immunomodulateurs telles que les cytokines. Ces cellules sécrètent également de nombreuses molécules bioactives qui contribuent à leurs fonctions cytotoxiques (Intermédiaires Réactifs de l'Oxygène (IROs), enzymes lytiques, cytokines) ou à leurs fonctions régulatrices (médiateurs lipidiques, facteurs de croissance, cytokines).

III.3.1. La phagocytose

La phagocytose est une étape très importante dans la défense anti-infectieuse car il s'agit d'un mécanisme qui permet aux cellules mononucléées de tuer les blastospores de *Candida albicans*.

III.3.1.1. La phagocytose de *Candida albicans* opsonisé

Anticorps

Les anticorps spécifiques anti-*Candida* entraînent l'ingestion de la levure par les macrophages [126]. En revanche, les monocytes humains phagocytent mieux les levures lorsque du sérum frais humain se trouve dans le milieu [127]. Dans ce cas, les propriétés d'opsonisation du sérum sont attribuées aux IgG présentes, et non aux fragments du complément. Ainsi, l'augmentation de la phagocytose de *Candida albicans* opsonisé suggère que l'immunité à médiation humorale joue un rôle dans la résistance de l'hôte à l'infection.

Les monocytes indifférenciés utilisent les récepteurs au fragment Fc pour une phagocytose optimale de *Candida albicans*, alors que les macrophages différenciés expriment d'autres molécules de surface capables de reconnaître le pathogène indépendamment des anticorps. En plus de l'activation et de l'état de différenciation du phagocyte, d'autres facteurs tels que l'isotype ou la spécificité de l'anticorps peuvent influencer l'efficacité de la reconnaissance de l'agent pathogène opsonisé.

Complément

Les fragments du complément peuvent aussi médier la phagocytose de *Candida albicans* par les macrophages [128]. En effet, un sérum inactivé par la chaleur entraîne une phagocytose moins efficace qu'un sérum frais chez le monocyte humain. Ceci suggère que les fragments du complément sont importants pour la phagocytose de *Candida albicans* par les monocytes humains. Ce phénomène requiert l'activation du complément *via* la mobilisation du calcium, et implique des composants de la voie classique et de la voie alterne du complément [129]. De la même façon que chez le monocyte humain, le macrophage murin semble phagocyter de façon plus efficace lorsque le complément est intact [130].

Mannose binding protein (MBP)

La MBP est une protéine appartenant à la famille des lectines de type C. Elle est sécrétée par le foie, et joue un rôle important dans la défense innée de l'hôte vis-à-vis de *Candida albicans*. La MBP isolée à partir de sérum de lapin est capable d'inhiber la phagocytose de *Candida albicans* par les macrophages murins ce qui suggère que la MBP interfère entre les interactions du macrophage avec le pathogène [131]. Ceci est renforcé par le fait que la MBP soluble, capable de se lier aux résidus mannose de la paroi du pathogène, peut limiter l'adhérence de *Candida albicans* au niveau des tissus de l'hôte. Ainsi, l'adhérence de *Candida albicans* aux cellules épithéliales buccales peut être bloquée par du mannose [131]. Les propriétés anti-adhésives de la MBP font de ce peptide une cible intéressante pour le traitement des candidoses mucosales ou mucocutanées.

Le taux sérique de MBP diminue de façon parallèle avec les taux de C3 au début de l'infection. Cette chute du taux de C3 est probablement due à la très grande capacité de la MBP à activer la voie classique du complément. En effet, la MBP possède une sous-unité sérine-protéase similaire à celle retrouvée sur les premiers éléments déclenchant la cascade du complément (C1r - C1s) [132]. De plus, l'activation du complément par la MBP déclenche la synthèse de cytokines et chimiokines amplifiant la réponse immunitaire.

III.3.1.2. La phagocytose de Candida albicans non-opsonisé

Les macrophages sont capables de reconnaître directement une grande diversité d'antigènes présents à la surface des microorganismes. Ainsi, la phagocytose peut aussi avoir lieu en absence d'opsonines.

Ce processus de phagocytose est initié par des récepteurs membranaires des macrophages capables de reconnaître des motifs conservés présents uniquement chez les pathogènes. Ces motifs sont appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) [133]. Ces structures, souvent invariantes, sont généralement présentes sur l'enveloppe des procaryotes et des champignons, et absentes des cellules de l'hôte. Ainsi, les PAMPs sont des entités biochimiques conservées à l'intérieur d'une même classe de pathogènes (bactéries, virus, champignons...) qui ne subissent pas de mutation au cours de l'évolution parce qu'elles sont indispensables à la survie des pathogènes (composants structuraux ou matériel génétique). Cette caractéristique fait des PAMPs une signature de l'infection. Parmi les PAMPs, citons le LPS, les peptidoglycanes, les mannanes, mais aussi l'ARN double brin (signature de l'infection virale) et l'ADN bactérien.

Les récepteurs capables de reconnaître les PAMPs sont appelés PRRs (Pattern Recognition Receptors). Ce sont des protéines sécrétées ou présentes à la surface des cellules de l'immunité innée. Leurs caractéristiques diffèrent des récepteurs spécifiques de l'antigène. Ainsi, ils ne sont pas générés par recombinaisons somatiques et ils ne sont pas distribués de façon clonale. Les PRRs sont plus spécifiques d'une classe de pathogènes que d'un pathogène donné. La détection des pathogènes par ces récepteurs donne lieu à des réponses rapides car elle n'implique pas de délai imposé par exemple par une expansion clonale des lymphocytes comme lors d'une réponse adaptative.

Cette reconnaissance directe est très importante :

- au niveau des tissus qui sont pauvres en opsonines (poumons, médulla rénale, fluide cébrospinal)
- au début de l'infection, quand la concentration en immunoglobulines est encore très faible
- chez les sujets immunodéprimés (SIDA, radio- ou chimiothérapie, traitement anti-rejet...) chez lesquels ne persistent bien souvent que les cellules de l'immunité innée.

Les TLR (Toll-like receptors)

Toll a été identifié tout d'abord chez la drosophile comme un gène impliqué dans l'ontogenèse et dans la résistance antimicrobienne. L'analyse génétique a montré que ce gène pouvait contrôler l'immunité antifongique. Ce paradigme a par la suite été étendu aux cellules des mammifères [134].

Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires qui sont classés dans la même famille de gènes grâce à leur grande homologie de séquence. Chez l'homme, 10 membres ont été clonés, caractérisés, et nommés de TLR-1 à TLR-10. Leur domaine extracellulaire se compose de séquences riches en leucines (LRRs : Leucine-rich repeats), alors que leur portion intracellulaire est extrêmement similaire au domaine intracytoplasmique du récepteur à l'IL-1 (IL-1R) [134].

Les TLRs peuvent être impliqués dans le processus de phagocytose de 4 façons différentes [135]:

- les TLRs peuvent fonctionner comme des récepteurs de phagocytose. En revanche, de nombreuses données récentes suggèrent que les TLRs ne seraient pas des récepteurs « directs » de phagocytose. Cette hypothèse s'appuie sur le fait que de nombreuses cellules non phagocytaires expriment le TLR et répondent à ses ligands, mais n'ingèrent pas les microbes. Autre exemple, une délétion du TLR-2 ou de MyD88 n'affecte pas la capacité des macrophages à internaliser le zymosan [136]. En fait, les TLRs et leurs ligands sont fondamentalement différents des récepteurs de phagocytose et de leurs ligands. Ainsi, tous les ligands des TLRs sont des molécules solubles, alors que les cibles des récepteurs de phagocytose sont regroupées à la surface d'un agent pathogène. Par exemple, le LPS soluble est reconnu par le TLR-4 (à 1 ng/ml), alors que le lipide A, partie reconnue par le TLR-4 est inaccessible à ce récepteur lorsqu'il est complexé dans la membrane des bactéries Gram⁻ [135]. En revanche, la reconnaissance d'un ligand soluble par les TLRs permet non seulement la détection d'un agent pathogène à distance, mais aussi la coordination de la réponse inflammatoire locale au site d'infection.
- la signalisation à partir des TLRs peut moduler l'efficacité de la formation du phagosome, et donc l'internalisation. Les TLRs peuvent ainsi activer de nombreuses molécules requises pour la phagocytose, telles que Rac1, des GTPases de la familles des Rho, ou encore la Pi3-kinase [137].
- la signalisation à partir des TLRs peut affecter la maturation du phagosome. Une fois formé, le phagosome évolue selon un processus de fusion des membranes intracellulaires vers la formation de vacuoles lytiques acides. Cette maturation du phagosome est requise pour la stérilisation des contenus ainsi que pour la présentation des antigènes dégradés sous forme

de peptides aux molécules CMH de classe II, favorisant ainsi l'activation des cellules T. Les TLRs jouent un rôle dans ces processus au cours de la phagocytose [135].

- les réponses transcriptionnelles médiées par les TLRs peuvent affecter des gènes impliqués dans toutes les étapes de la phagocytose. En effet, les TLRs peuvent activer la transcription de nombreux gènes, dont beaucoup participent à la phagocytose. Par exemple, la stimulation des macrophages par le LPS augmente l'expression des récepteurs scavengers A et MARCO [138] mais diminue l'expression du CD36.

Les récepteurs scavengers

Les récepteurs scavengers sont exprimés à la surface des macrophages, des cellules dendritiques et de certaines cellules endothéliales. Ces récepteurs jouent un rôle dans la phagocytose et l'élimination des molécules de l'hôte et des cellules apoptotiques. Ils peuvent aussi lier et internaliser des microorganismes (bactéries Gram⁺ et Gram⁻) et leurs produits (acide lipotéichoïque (LTA), LPS, motifs CpG de l'ADN bactérien). Ces récepteurs transmembranaires possèdent une structure variable, composée de molécules de collagène et de domaines riches en cystéines ou de type C-lectine.

Parmi ces récepteurs, les membres de la famille SR-A (Scavenger Receptor Class A) diffèrent par la présence ou l'absence de domaines riches en cystéines, dont on ne connaît pas encore précisément la fonction [139]. Le site de liaison semble être attribué au domaine de collagène, alors que la queue cytoplasmique contient des sites d'interaction avec la protéine kinase C (PKC). Ces récepteurs, exprimés sur la majeure partie des macrophages tissulaires, mais non sur les monocytes et les neutrophiles, sont impliqués dans la liaison au lipide A du LPS des bactéries Gram⁻ [140] et dans la reconnaissance du LTA des bactéries Gram⁺ [141].

MARCO est un récepteur scavenger de type A particulier, présent sur les macrophages, et possédant des structures de collagène et des domaines riches en cystéines [138]. Chez l'homme, MARCO lie les bactéries et joue un rôle dans la résistance de l'hôte à l'infection.

Les récepteurs scavengers de classe B (CD36, SR-B1), de classe D, de classe F et bien d'autres encore ont été décrits comme liant et internalisant les LDL oxydées et de nombreux polyanions, mais pas les bactéries. Au laboratoire, il a été montré que les macrophages humains M2 stimulés par l'IL-13 expriment plus fortement le CD36 *via* l'activation de PPAR γ , ce qui conduit à l'élimination des érythrocytes parasités par *Plasmodium falciparum* [116].

Récepteur mannose

Le récepteur mannose (RM ou CD206) est le premier découvert parmi une famille de récepteurs d'endocytose qui possèdent la même structure [142]. En effet, ce récepteur se compose d'une région extracellulaire contenant un domaine riche en cystéines (CR), un domaine composé de répétitions de molécules de fibronectine de type II (FNII) et d'un domaine composé de 8 lectines (CTLD) reconnaissant les carbohydrates à la surface des pathogènes. Il possède aussi une partie transmembranaire, et une courte queue cytoplasmique [143] (figure 6). L'analyse de la séquence de ce récepteur et de sa liaison aux sucres a montré que le RM pouvait reconnaître des carbohydrates par son domaine CTLD, mais aussi des sucres sulfatés par son domaine CR.

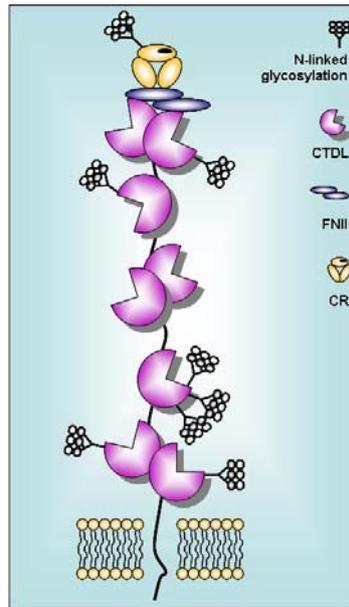


Figure 6 : structure du récepteur mannose
(d'après Taylor, Trends Immunol, 2005 [143])

La majorité de récepteur mannose se situe dans la voie endocytaire, avec seulement environ 15 % de l'expression de ce récepteur à la surface des cellules [142]. De plus, une forme soluble de ce récepteur (RMs) a pu être détecté dans le surnageant de cellules RM⁺, mais aussi dans le sérum de souris [144]. Chez le macrophage péritonéal murin, la formation de RMs se fait par clivage protéolytique de la forme cellulaire grâce à une métalloprotéase [144]. La régulation de ce phénomène n'est pas décrite à ce jour, cependant il a été montré que chez l'homme, l'infection à *Pneumocystis carinii* augmente la production de RMs par les macrophages [145].

L'expression du récepteur mannose a été beaucoup étudiée chez la souris. En effet, le RM est présent dans de nombreux tissus murins tels que la microglie périvasculaire, les cellules de Kupffer, la lamina propria, de derme, mais aussi dans les macrophages péritonéaux et alvéolaires. Au niveau des organes lymphoïdes, le RM se trouve dans la pulpe rouge de la rate, dans la medulla des nœuds lymphatiques, dans le cortex et dans la jonction corticomédullaire du thymus [146]. L'expression du RM n'est pas restreinte aux macrophages puisque il peut être exprimé par l'endothélium hépatique et lymphatique, les cellules de reins, les cellules musculaires lisses de la trachée, l'épithélium rétinien. La régulation de l'expression du RM par les cytokines et d'autres substances a été démontrée. Ainsi, l'IL-4 [147, 148], l'IL-13 [115, 147, 149], l'IL-10 [150], l'IFN- α et β [151], la 1,25-dihydroxyvitamine D3 [142, 152] augmentent son expression à la surface des macrophages favorisant l'élimination de *Candida albicans* [115], alors que l'IFN- γ la diminue [147, 153]. D'autres facteurs peuvent moduler négativement l'expression du récepteur mannose tels que les pathogènes et leurs produits [154, 155], et positivement tels que la prostaglandine de type E [156, 157]. Chez l'homme, il n'existe que peu

d'études concernant l'expression du RM. Il est exprimé à la surface des monocytes en maturation et aussi des cellules dendritiques.

Les mécanismes de régulation du récepteur mannose restent à ce jour mal connus. Seule une étude montre l'implication des facteurs de transcription SP1 et PU.1 [158]. Au laboratoire, nous avons montré *in vitro* sur des macrophages péritonéaux murins que le facteur de transcription PPAR γ était impliqué dans l'augmentation de l'expression du RM par l'IL-13 [115].

Récepteur β -glucane : Dectine-1

Dectine-1 est un récepteur lectine identifié comme le PRR principal pour la reconnaissance des motifs β -glucanes à la surface des agents pathogènes. Dectine-1 s'exprime à la surface des macrophages, mais aussi d'autres types cellulaires tels que les neutrophiles, les cellules dendritiques, ou encore les cellules de langerhans [159, 160]. Dectine-1 est un récepteur transmembranaire de type II, possédant une région extracellulaire composée d'un seul domaine lectine de type C (CTDL) reconnaissant les β -glucanes de la paroi des pathogènes. Ce récepteur possède aussi une courte queue intracytoplasmique composé d'un motif ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activative Motif) qui est phosphorylé à la suite de la liaison du récepteur à son ligand [136]. Ce motif est nécessaire à la production de cytokines proinflammatoires, en collaboration avec le TLR-2, ainsi qu'à la sécrétion d'agents oxydants en réponse à un ligand de type β -glucane, tels que les champignons [161] (figure 7).

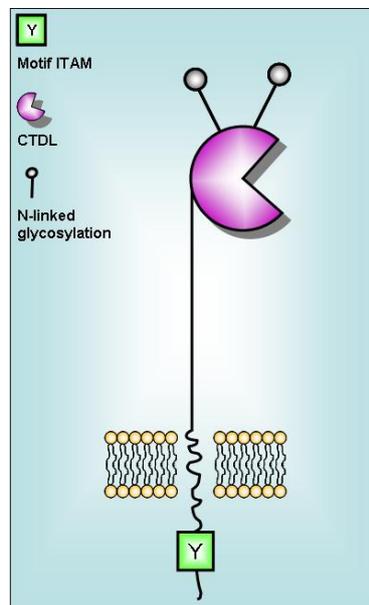


Figure 7 : structure du récepteur β -glucane Dectine-1
(d'après Herre, Mol Immunol, 2004 [160])

Dectine-1 reconnaît et phagocyte les particules de zymosan, une particule riche en β -glucanes extraite de la paroi cellulaire de *Saccharomyces cerevisiae* [162]. Cette interaction peut être inhibée

par des polymères solubles de glucanes liés en β -1,3 et β -1,6 extraits de la paroi de champignons, de plantes et de bactéries [160]. La laminarine, extraite de la paroi de *Laminaria digitata* en est le plus puissant inhibiteur.

La reconnaissance et la phagocytose de levures telles que *Saccharomyces cerevisiae* ou *Candida albicans* dépend de leur composition en mannanes et en glucanes. Dectine-1 reconnaît et phagocyte ces levures grâce aux β -glucanes. De façon intéressante, *Saccharomyces cerevisiae*, levure non pathogène, est mieux reconnue par Dectine-1 que la levure opportuniste pathogénique *Candida albicans*. De plus, Dectine-1 est incapable de reconnaître certains pathogènes comme *Cryptococcus neoformans* qui possèdent pourtant des motifs β -glucanes dans leurs paroi. Ainsi, les pathogènes auraient la possibilité de masquer leurs antigènes de façon à échapper à la reconnaissance par le système immunitaire, et en particulier par Dectine-1 [160].

Malgré la présence d'un motif ITAM, il a été rapporté que la protéine kinase Syk ne serait pas impliquée dans le processus de phagocytose par Dectine-1 [163]. Des travaux plus récents montrent que ce motif ne fonctionnerait pas comme un véritable motif ITAM, et que la kinase Syk serait bien requise pour l'activation de la production d'espèces réactives de l'oxygène [164]. En revanche, cette activation de Syk serait restreinte à une sous population de macrophages, dont la proportion est modulée par les cytokines, et qui reflète la maturité de la réponse immunitaire [164].

Bien que les macrophages phagocytent les levures, ces dernières ne sont pas toujours tuées par les cellules phagocytaires. En effet, *Candida albicans* a mis en place des mécanismes d'échappement qui consistent en la destruction du phagocyte grâce à la formation de tubes germinatifs quelques heures après leur ingestion [128]. De plus, certains récepteurs de phagocytose tels que Dectine-1 sont incapables de reconnaître la forme filamenteuse du champignon [165]. C'est la raison pour laquelle le macrophage emploie d'autres stratégies telles que la sécrétions d'agents oxydants pour éliminer les pathogènes.

III.3.2. La production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (IROs)

III.3.2.1. La NADPH oxydase

Les intermédiaires réactifs de l'oxygène sont formés en permanence dans les mitochondries et dans les phagolysosomes au cours de la phagocytose. Ces dérivés actifs de l'oxygène participent à la destruction de nombreux microorganismes comme notamment *Candida albicans*.

L'activation des macrophages entraîne une « explosion respiratoire » (oxydative burst), c'est à dire une intensification du métabolisme de l'oxygène et des processus oxydatifs caractéristiques des cellules aérobies, aboutissant à la formation de radicaux dérivés de l'oxygène, appelés encore intermédiaires réactifs de l'oxygènes (IROs). Ces molécules sont très instables et très réactives.

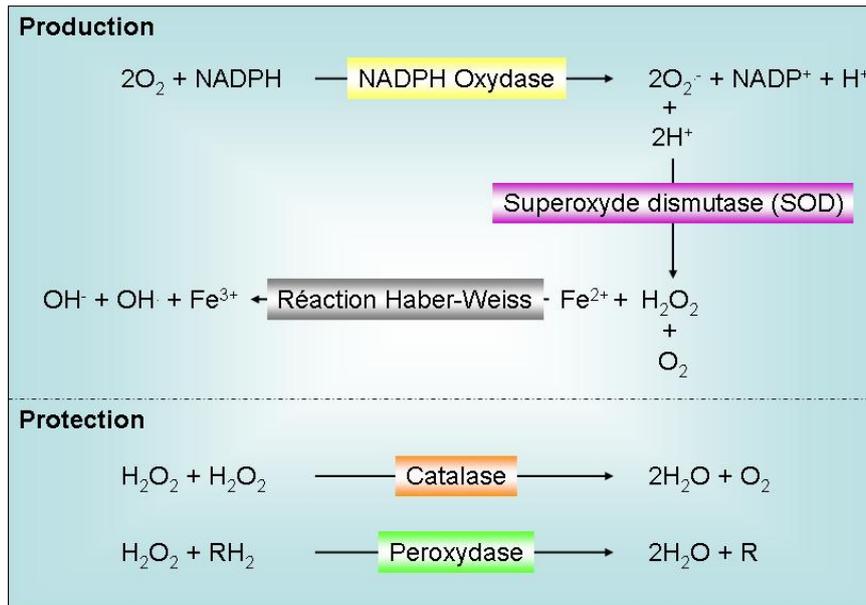


Figure 8 : Principales voies enzymatiques de la production et du contrôle de l'ion superoxyde et du peroxyde d'hydrogène dans la cellule

Ainsi, l'anion superoxyde O_2^- est formé par réduction univalente de l'oxygène moléculaire sous l'effet de la NADPH-oxydase. Cet anion peut être dismuté en peroxyde d'hydrogène H_2O_2 par l'action de la superoxyde dismutase (SOD). En présence d'ions métal (Fe^{2+}), des radicaux hydroxyles OH^- particulièrement toxiques sont formés à partir du peroxyde d'hydrogène. Pour se protéger, la cellule dispose d'enzymes (peroxydases et catalases) capables d'éliminer le peroxyde d'hydrogène afin de limiter sa production [166, 167] (figure 8).

Les NADPH oxydases sont des enzymes associées aux membranes présentes sur des cellules d'origine mésodermique, telles que les macrophages. La plus étudiée d'entre elles est la NADPH oxydase qui catalyse la production d'anion superoxyde O_2^- par réduction de l'oxygène, le NADPH étant le donneur d'électron. Cet anion superoxyde est utilisé par les macrophages pour éliminer les microorganismes, mais ils peuvent aussi causer des « dommages collatéraux » au niveau des tissus de l'hôte. Par conséquent, leur production se doit d'être bien contrôlée, et leur génération ne doit avoir lieu uniquement que si nécessaire [166].

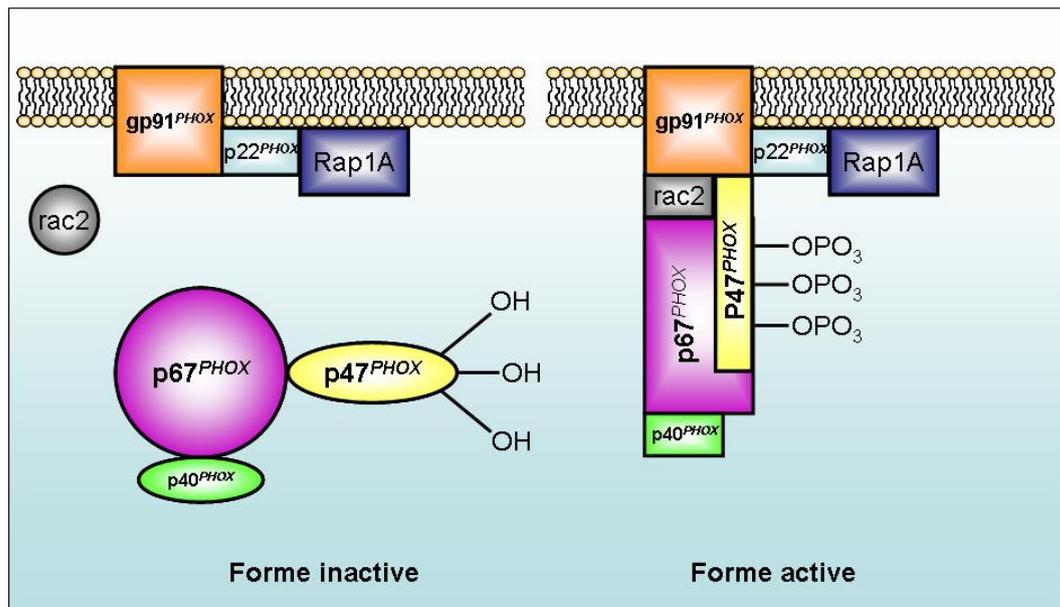


Figure 9 : Structure et activation de la NADPH oxydase
(d'après Babior, Blood, 1999 [166])

La structure de la NADPH oxydase est la suivante : elle se compose de 5 éléments : p40^{PHOX} (PHOX pour PHagocyte OXydase), p47^{PHOX}, p67^{PHOX}, p22^{PHOX} et gp91^{PHOX}. Dans le macrophage au repos, 3 de ces 5 éléments (p40^{PHOX}, p47^{PHOX}, p67^{PHOX}) sont complexés au niveau du cytosol. Les 2 autres (p22^{PHOX} et gp91^{PHOX}) sont localisés à la membrane plasmique de la cellule (ou à la membrane des mitochondries), où ils s'hétérodimérisent pour former une flavohémoprotéine connue sous le nom de cytochrome b₅₅₈. En réponse à un stimulus du macrophage, p47^{PHOX} va être phosphorylé et c'est tout le complexe cytoplasmique qui est recruté à la membrane et qui s'associe au cytochrome b₅₅₈. Ainsi, l'oxydase est fonctionnelle et peut transférer des électrons du substrat vers l'oxygène. L'activation de la NADPH oxydase requiert la participation de 2 autres protéines : rac2 et rap1A. Au cours de l'activation, rac2 se lie à une molécule de GTP et migre à la membrane avec le complexe cytoplasmique activé [166] (figure 9).

III.3.2.2. Régulation et rôle de la production d'IROs

L'activité candidicide des macrophages est associée à leur capacité à produire l'anion superoxyde, un des produits des métabolites des intermédiaires réactifs de l'oxygène [128]. En effet, la surproduction de ces IROs entraîne la destruction du champignon en provoquant la désorganisation des membranes cytoplasmiques et mitochondriales, la dégradation des protéines et l'altération des acides nucléiques des macromolécules de la levure.

La capacité des macrophages à produire ces composés radicalaires dépend de leur état d'activation et de leur environnement cellulaire. En effet, l'« explosion respiratoire » est déclenchée et n'atteint un niveau efficace qu'après activation des macrophages par des cytokines telle que l'IFN- γ . Ainsi, les macrophages murins stimulés par l'IFN- γ déclenchent la production d'agents oxydants directement

efficaces sur les éléments fongiques [128, 168]. Au laboratoire, nous avons montré *in vitro* que l'IL-13 et les thiazolidinediones augmentaient la sécrétion d'agents oxydants par les macrophages péritonéaux murins en réponse à *Candida albicans* et cela du fait de l'induction du récepteur mannose [115].

A l'inverse, plusieurs études montrent que l'IL-4 comme l'IL-13 inhibent *in vitro* la sécrétion par les monocytes humains d'agents oxydants déclenchée par le 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) [169, 170]. Toutefois, dans les mêmes conditions, cette « explosion respiratoire » par le TPA sur les macrophages péritonéaux murins est augmentée par l'IL-4, ce qui montre que l'effet des cytokines Th2 sur le métabolisme oxydatif, aboutissant à la synthèse des IROs, est espèce dépendante [171].

La production d'IROs par les macrophages est dépendante de la voie de signalisation impliquée, mais aussi du récepteur qui va déclencher cette voie en amont. Il a été montré au laboratoire sur des macrophages murins, grâce à l'utilisation d'antisens du récepteur mannose, que l'augmentation de la production des IROs par l'IL-13 en réponse à *Candida albicans* est corrélée à l'expression du récepteur mannose. Cette production de RLO favorise l'élimination de *Candida albicans in vitro* [115]. Le mécanisme de couplage du récepteur mannose avec la NADPH oxydase reste à préciser.

D'autres études montrent qu'en plus de médier la phagocytose, Dectine-1 est aussi capable d'entraîner la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène par les macrophages stimulés avec du zymosan ou des levures. Cette induction se fait grâce à un couplage avec le TLR-2 qui stimule l'expression des composants de la NADPH oxydase [136].

III.3.3. La production de monoxyde d'azote (NO)

Le monoxyde d'azote (NO) est une molécule produite par les macrophages qui participe à la destruction d'organismes pathogènes, ainsi qu'à l'élimination de cellules de l'organisme qui sont sénescents, tumorales ou infectées par un virus ou une bactérie. Le NO est synthétisé par de nombreuses NO synthases (constitutives ou inductibles). Ces enzymes oxydent la L-arginine en L-citrulline [172]. Dans des conditions d'inflammation ou d'infection, la NOS inductible (iNOS) est exprimée et produit du NO en quantité 1000 fois plus importante [173].

Les blastospores de *Candida albicans* sont susceptibles au NO produit par les macrophages murins [174, 175]. En effet, les macrophages péritonéaux de souris beige immunodéficientes ont une faible activité candidicide due à une déficience en NO synthase inductible [174]. En revanche, le NO ne semble pas être directement l'agent responsable de l'élimination de *Candida albicans*. En effet, l'utilisation d'un générateur de NO inhibe la croissance de *Candida albicans*, mais n'a pas d'effet candidicide. Le NO n'aurait alors qu'un effet candidistatique et semble plutôt être associé ou induire d'autres mécanismes candidicides chez le macrophage [176].

La faible activité candidicide du NO peut être expliquée par la production de peroxy-nitrite à partir du NO et de l'anion superoxyde selon l'équation :



La synthèse de NO est régulée par les cytokines. En effet, les macrophages péritonéaux murins traités avec de l'IFN- γ et infectés par *Candida albicans* possèdent une forte activité fongicide *in vitro*, corrélée à une augmentation de la concentration en nitrites dans le surnageant de culture. Ainsi, l'IFN- γ induit l'expression de la iNOS et la production de NO par les macrophages de souris [177]. Au contraire, l'IL-4 et l'IL-10 inhibent la production de NO des macrophages activés par l'IFN- γ [178]. Cette inhibition est corrélée à l'effet répresseur des cytokines Th2 sur l'expression de la iNOS [177].

III.3.4. Les cytokines et les médiateurs immunomodulateurs

III.2.4.1. Rôle des cytokines sécrétées par le macrophage

La présence de cellules de l'immunité innée, telles que les macrophages, activées par la phagocytose de *Candida albicans*, est requise pour l'activation d'une réponse immunitaire de type Th1, médiée par les lymphocytes T CD4⁺. Les lymphocytes Th1 ou Th2 se développent à partir un progéniteur naïf commun Th0, sous l'influence de nombreux paramètres environnementaux tels que des cytokines [179]. Ainsi, ces cytokines produites par les macrophages semblent jouer un rôle majeur dans cette différenciation des cellules T, en agissant non seulement comme des modulateurs des fonctions effectrices antifongiques, mais aussi comme des régulateurs clés impliqués dans le développement du répertoire de ces cellules (figure 10).

Parmi ces cytokines, l'IL-12 sécrétée par les macrophages joue un rôle prédominant dans la polarisation des lymphocytes T [180]. En effet, parmi les T CD4⁺, les lymphocytes T naïfs récemment activés et les lymphocytes Th1 possèdent un récepteur fonctionnel à l'IL-12, alors que les lymphocytes Th2 l'ont perdu au cours de leur différenciation [181]. Cette propriété confère aux lymphocytes Th1 la capacité de sécréter de l'IFN- γ , cytokine activatrice des macrophages, en réponse à l'IL-12.

L'IL-12 est une cytokine capitale dans la résistance de l'hôte à *Candida albicans*. En effet, l'ARNm de l'IL-12 est détecté dans les macrophages de souris résistantes, mais pas dans ceux de souris susceptibles à *Candida albicans* [182]. De plus, il a été montré que des souris déficientes en IL-12 sont beaucoup plus susceptibles à une candidose gastro-intestinale, et sont aussi incapables de développer une résistance de type Th1 [183].

L'IFN- γ lui aussi joue un rôle très important dans le sens où il s'agit d'une substance majeure d'activation des phagocytes. Ainsi, en réponse à l'IFN- γ , le macrophage augmente sa sécrétion d'IL-12, et maintient l'expression de récepteurs fonctionnels à l'IL-12 sur les lymphocytes Th1 [184, 185]. D'autre part, l'IFN- γ inhibe la prolifération des lymphocytes Th2 et la production d'IL-4, associées à une plus grande susceptibilité à l'infection [186].

L'IFN- γ joue un rôle critique dans la protection de l'hôte. En effet, le messenger de l'IFN- γ peut être détecté en grande quantité dans les monocytes de patients qui ont été exposés à *Candida albicans* [187]. De plus, l'administration d'IFN- γ à des souris infectées de façon létale augmente de façon

significative la survie de ces animaux [188, 189], et l'exposition *in vitro* à de l'IFN- γ augmente les capacités de leurs macrophages à éliminer *Candida albicans* [189]. L'IFN- γ est rapidement produit après l'infection, et ce à la fois chez les souris résistantes et susceptibles [182]. Chez les souris résistantes, la neutralisation *in vivo* de l'IFN- γ empêche le développement d'une immunité Th1 protectrice [190].

L'IL-18, autre cytokine produite par les macrophages, joue un rôle important dans les réponses Th1, notamment par sa capacité à induire la production d'IFN- γ par les cellules T et NK [191, 192].

Les macrophages activés sécrètent aussi du TNF- α au cours des premiers stades de l'infection [193-195]. Cette sécrétion de TNF- α entraîne le recrutement et l'activation des neutrophiles au site d'infection, mais diminue aussi l'activité antifongique dirigée contre les filaments, ce qui suggère que le TNF- α peut avoir des effets bénéfiques mais aussi délétères pour la réponse immunitaire [196]. Des études réalisées avec des souris déficientes en TNF- α montrent que ces animaux sont plus susceptibles au développement d'une candidose. Ce phénomène est dû à un défaut de recrutement des neutrophiles et à un défaut de phagocytose des levures [197]. L'administration de TNF- α à ces souris augmente à la fois les fonctions effectrices antifongiques et les fonctions de co-stimulation des cellules phagocytaires, et favorise donc la résistance à une candidose [198].

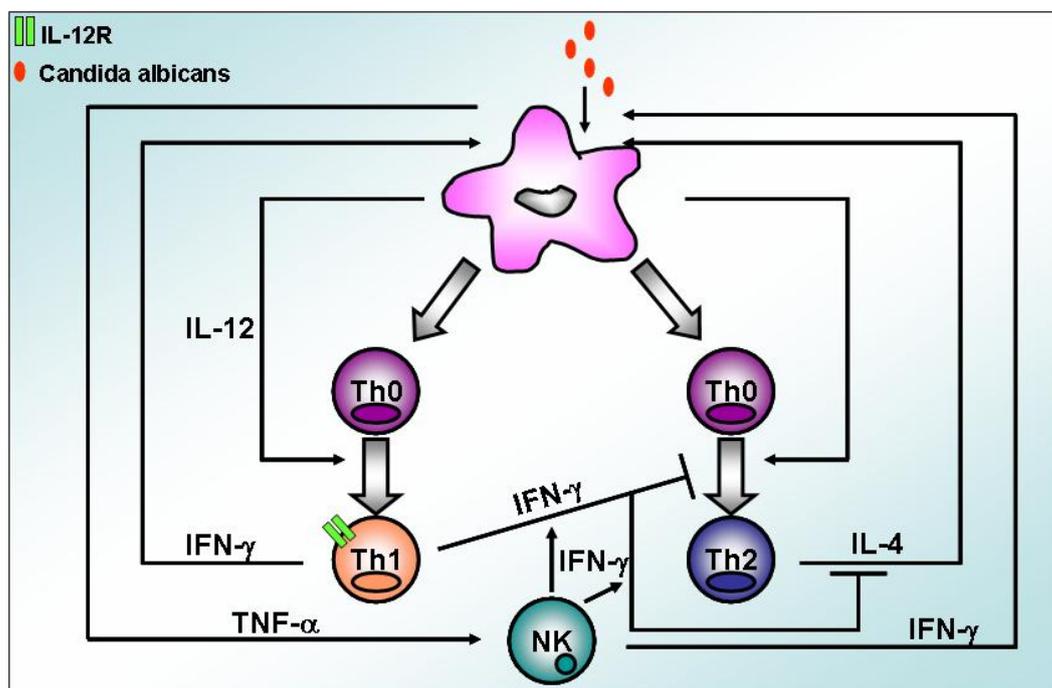


Figure 10 : cytokines sécrétées par les macrophages

III.3.4.2. Rôle des autres cytokines présentes au cours de l'infection

L'IL-4 est une cytokine Th2 qui oriente la réponse immunitaire vers un profil Th2, responsable de la sévérité de la candidose. Des études menées sur des modèles murins de candidoses mucorales ou systémiques démontrent la forte corrélation entre la sécrétion d'IL-4, l'installation d'une réponse Th2, et la susceptibilité des animaux à l'infection. De plus, cette production d'IL-4 semble être strictement dépendante de la dose de pathogène [199].

Au début de l'infection, l'administration d'IL-4 augmente la sévérité de la candidose, à la fois chez des souris résistantes et susceptibles à l'infection [186]. Ce phénomène est corrélé à une diminution des fonctions effectrices des cellules phagocytaires [186], une inhibition de la synthèse de NO [178], et au développement d'une réponse de type Th2 [186]. De plus, dans un contexte Th2, la neutralisation de l'IL-4 est associée avec un taux de rémission de 90%, et avec l'établissement d'une réponse immunitaire de type Th1 qui confère une protection longue durée contre ce pathogène [200, 201]. De la même façon, l'administration d'un antagoniste soluble du récepteur à l'IL-4, en combinaison ou non avec de l'IL-12, à des souris ayant développé une candidose, augmente l'élimination de l'agent pathogène et stimule les résistances associées au profil Th1 [201, 202].

Toutefois, des études récentes sur les souris déficientes en IL-4 montrent que cette cytokine peut agir à 2 niveaux différents [203]. Au début d'une infection systémique, l'IFN- γ rend ces souris déficientes en IL-4 plus résistantes que les animaux sauvages grâce à l'activation des fonctions anti-infectieuses des cellules immunitaires et notamment des macrophages. En revanche, lorsque l'infection est installée, les souris déficientes en IL-4 ne contrôlent plus l'infection et meurent. De plus, ces souris sont incapables d'acquérir une résistance de type Th1 en réponse à un vaccin contenant la levure. Ceci est corrélé à un défaut de production de l'IFN- γ et d'IL-12. Le traitement de ces souris déficientes en IL-4 avec de l'IL-4 exogène augmente considérablement la réponse à l'infection, et restaure la production d'IFN- γ et d'IL-12 [203]. Chez l'homme, l'IL-4 et l'IL-13 entraînent la production d'IL-12 par les monocytes, via l'inhibition de l'IL-10 [204], et par les neutrophiles via l'induction du récepteur à l'IL-4 [203].

Au laboratoire, il a été montré que dans un contexte de non-opsonisation, due à un déficit de cellules immunitaires adaptatives, l'IL-4 et l'IL-13 entraînaient une potentialisation des fonctions anti-infectieuses des macrophages, conduisant à l'élimination de *Candida albicans in vitro* [115, 147]. Ces résultats suggèrent que dans un contexte où seules les défenses immunitaires innées existent, les cytokines Th2 pourraient jouer un rôle protecteur en amplifiant les mécanismes de défense des macrophages.

Dans l'infection à *Candida albicans*, l'IL-6 est une cytokine multifonctionnelle, produite par les macrophages [205] ou les lymphocytes T CD₄⁺ stimulés [200], rapidement détectée dans le sérum [206, 207]. L'IL-6 peut augmenter la production d'IL-4 par les lymphocytes T [208] ce qui lui confère un rôle délétère dans l'infection. En revanche, d'autres études montrent que les souris déficientes en IL-6 sont plus susceptibles à *Candida albicans*, et que, chez ces souris, la dissémination est plus importante [207]. Ceci s'explique par des défauts fonctionnels des neutrophiles et par une augmentation de la sécrétion d'IL-10 qui empêche le développement d'une réponse Th1 [207]. Cet

effet peut être réversé par la neutralisation de l'IL-10 endogène, ou bien par l'administration d'IL-6 exogène. Comme pour l'IL-4, les effets contradictoires de l'IL-6 pourraient s'expliquer par les taux physiologiques de cette cytokine qui varient au cours de l'infection, et qui modulent les effets anti-infectieux ou délétères de l'IL-6.

L'IL-10 est une cytokine inhibitrice des réponses immunitaires innées et inflammatoires, et activatrice du développement des lymphocytes T [209]. Bien que cette cytokine n'entraîne pas directement la différenciation des lymphocytes en Th2, de nombreuses études montrent que l'IL-10 joue un rôle indirect sur les lymphocytes en diminuant l'expression des molécules de co-stimulation et la production de cytokines par les cellules de l'immunité innée telles que les macrophages et les cellules dendritiques [210, 211]. Ainsi, l'IL-10 entraîne l'inhibition de la production d'IL-12, qui à son tour empêche la sécrétion d'IFN- γ et donc le développement d'une réponse Th1 protectrice [209].

L'IL-10 exerce des effets inhibiteurs à la fois sur les fonctions effectrices des macrophages et sur la réponse de type Th1 [186, 212, 213]. De plus, l'IL-10 empêche la production de NO entraînée par l'IFN- γ [178, 212]. La neutralisation de l'IL-10 endogène augmente la production de NO et protège les souris contre une infection létale [212]. Les souris déficientes en IL-10 sont plus résistantes à l'infection que les sauvages. Cette résistance accrue est associée à une augmentation des réponses antifongiques innées et adaptatives, telles que la production d'IL-12, de NO, de TNF- α et d'IFN- γ [213]. Ces résultats sont similaires chez l'homme [214, 215].

En revanche, la production d'IL-10 en réponse à *Candida albicans* ne diminue pas la capacité des souris résistantes à développer une réponse Th1, et de faibles doses d'IL-10 améliorent même la résistance à l'infection de souris susceptibles [213]. Encore une fois, il semblerait que le taux physiologique d'IL-10 conditionne les effets de cette dernière sur la réponse anti-infectieuse.

III.3.5. Rôle des eicosanoïdes produits par les macrophages

III.3.5.1. Production des eicosanoïdes

Les macrophages produisent aussi des médiateurs lipidiques appelés eicosanoïdes, dérivés d'acides gras poly-insaturés à 20 atomes de carbone et à 3 à 5 doubles liaisons *cis*. Ces médiateurs ne sont pas stockés, mais synthétisés *de novo* à partir de l'acide arachidonique (AA), acide gras essentiel prépondérant parmi les lipides cellulaires [216, 217]. Ils peuvent agir comme des messagers cellulaires capables de réguler les fonctions de cellules cibles, dont les macrophages eux-mêmes, et comme des messagers intracellulaires impliqués dans la différenciation des cellules. Ainsi, ils constituent des ligands de récepteurs qui peuvent être soit membranaires à la surface des cellules, soit nucléaires. Dans cette étude, nous nous attachons à étudier les conséquences de la liaison de ces ligands lipidiques à des récepteurs nucléaires tels que PPAR γ (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor gamma).

Ainsi, l'AA est libéré des phospholipides membranaires sous l'action d'une phospholipase A₂ (PLA₂), en réponse à toute une batterie de stimuli activateurs (médiateurs pro-inflammatoires, hormones,

agents pathogènes et leurs produits...). Différents types de PLA₂ ont été identifiés à ce jour, et notamment la cPLA₂ (PLA₂ cytosolique), la sPLA₂ (PLA₂ sécrétée), et la iPLA₂ (PLA₂ indépendante du calcium) [218]. Mais malgré l'existence de ces nombreuses enzymes, la cPLA₂ semble jouer un rôle clé dans la mobilisation de l'AA estérifié dans la membrane plasmique. En effet, les cellules déficientes en cette enzyme ne produisent pas d'eicosanoïdes.

L'AA mobilisé des phospholipides membranaires peut être converti en une multitude de métabolites actifs à travers plusieurs voies métaboliques. Notamment, l'AA peut être métabolisé en prostaglandines par les cyclooxygénases (COXs) ou en leukotriènes par les lipoxygénases (LOXs). Il existe deux isozymes de COXs : COX-1 est la forme constitutive, et COX-2 est la forme inducible. Ces deux enzymes catalysent la production de PGG₂, métabolite instable, puis de PGH₂, qui ensuite va être converti par des prostaglandines synthases spécifiques en produits biologiquement actifs tels que PGE₂, PGF₂, PGI₂, PGD₂ et TXA₂, appelés prostanoides (figure 11). Ces prostanoides comprennent les prostaglandines (PGG₂, PGH₂, PGE₂, PGF₂, PGD₂), les prostacyclines (PGI₂) et les thromboxanes (TXA₂).

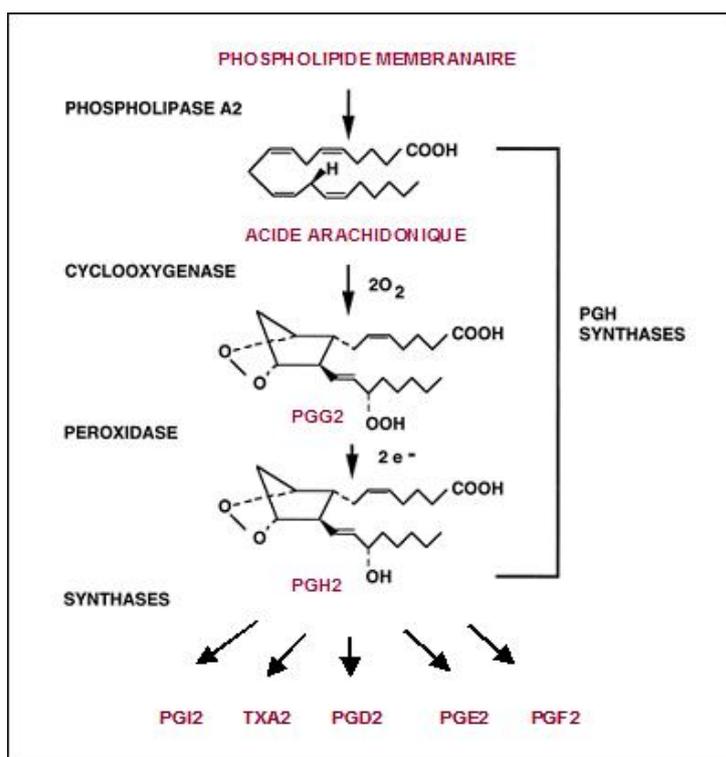


Figure 11 : Production des prostaglandines à partir de l'acide arachidonique membranaire.

Si les taux d'eicosanoïdes sont relativement faibles au niveau des tissus non inflammés, ils peuvent augmenter de façon considérable au cours d'une inflammation aigue avant le recrutement et l'infiltration des leukocytes. Les macrophages sont les principales cellules productrices, mais d'autres

cellules du système immunitaire inné telles que les cellules dendritiques ou encore les neutrophiles peuvent synthétiser des prostanoïdes.

Ces substances peuvent agir localement de façon autocrine ou paracrine et ainsi affecter les fonctions des cellules voisines, en se fixant sur des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G [219]. La distribution de ces récepteurs à la surface des cellules immunitaires diffère de la distribution des enzymes qui les produisent. En effet, alors que ces récepteurs s'expriment sur les cellules de l'immunité innée et adaptative, les enzymes de production des prostanoïdes ne s'expriment que dans les phagocytes. Par conséquent, les macrophages activés au site d'inflammation vont produire des prostanoïdes. Ces prostanoïdes vont moduler leurs propres fonctions de façon autocrine, mais vont aussi réguler, de façon paracrine, avec d'autres facteurs, l'activation des cellules de l'immunité adaptative [217].

L'activation des cellules immunitaires par les prostanoïdes sécrétés par les macrophages dépend du type de récepteur présent sur la cellule en question. Ainsi, les récepteurs DP, EP2, EP4, IP et EP3 reconnaissent les prostanoïdes, se couplent à des protéines Gs et augmentent les taux d'AMPc cellulaires [220-222], inhibant les fonctions des cellules T et d'autres cellules immunitaires. Les récepteurs EP1, FP, IP, TP et d'autres isoformes de EP3 se couplent quant à eux à des protéines Gq, et augmentent les taux de calcium intracellulaires en régulant la PLC (phospholipase C) [223], conduisant à l'activation des cellules immunitaires [219, 224].

III.3.5.2. Effets des prostaglandines sur les cellules immunitaires et leurs fonctions

Les prostaglandines produites par les macrophages, et en particulier la PGE₂, modulent l'activité des cellules de l'immunité telles que les macrophages eux-mêmes et les cellules dendritiques en modifiant leur profil de sécrétion de cytokines [225]. Ainsi, PGE₂ inhibe la production de cytokines pro-inflammatoires par le macrophage telles que le TNF- α , l'IL-1, l'IL-8 et l'IL-12, et augmente la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-6 et l'IL-10, favorisant le développement d'une réponse Th2 chez le macrophage [224, 226, 227]. Par cette voie, PGE₂ favorise aussi la production de cytokines Th2 par les lymphocytes T telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-6 et l'IL-10, et inhibe la production d'IFN- γ et d'IL-2 [225, 228, 229].

Outre leur action médiée par la fixation sur un récepteur membranaire, certaines prostaglandines peuvent agir en se fixant dans le cytoplasme de la cellule à un récepteur nucléaire. C'est le cas de la 15-déoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J₂ (15d-PGJ₂). La 15d-PGJ₂ est un métabolite de la PGD₂. Elle est produite dans des tissus et des cellules variés, et dans les macrophages en particulier. La 15d-PGJ₂ possède une très forte activité inhibitrice sur la production des cytokines pro-inflammatoires produites par les macrophages et les monocytes activés [230-233]. Ces effets seraient entre autre le résultat de la liaison de la 15d-PGJ₂ au récepteur nucléaire PPAR γ .

3- Rôle de PPAR γ

I. Les récepteurs nucléaires PPARs

Tous les membres de la superfamille des facteurs de transcription dépendants d'un ligand jouent une multitude de rôles essentiels notamment au cours du développement, dans le maintien de l'homéostasie, dans la reproduction ou encore dans la réponse immunitaire [234-237]. Plusieurs membres de cette famille, tels que les récepteurs aux hormones stéroïdes (récepteurs aux oestrogènes ER) ou encore les PPARs, constituent des cibles intéressantes pour le développement de médicaments qui pourraient être utilisés dans le traitement de nombreuses pathologies. Ces dernières années, les récepteurs nucléaires se sont révélés très informatifs et ont permis la mise en place de modèles nécessaires à la compréhension de la régulation de l'expression des gènes. Par exemple, selon le traitement des cellules avec des ligands synthétiques ou naturels, ces récepteurs ont la capacité de passer d'un état transcriptionnellement répressif à un état transcriptionnellement activateur. Ce phénomène a considérablement accéléré notre compréhension des séquences de régulation contrôlant l'expression des gènes ainsi que des réactions biochimiques cellulaires qui mènent à cette activation ou à cette répression transcriptionnelle. Ainsi, une meilleure connaissance des membres de la superfamille des récepteurs nucléaires ouvre de nouvelles frontières dans l'étude de leurs effets biologiques, et nous permet de les envisager en tant que cibles thérapeutiques dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires, métaboliques et inflammatoires [235-237].

I.1. Généralités sur les PPARs

Les récepteurs nucléaires PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptors) sont des facteurs de transcription activés par des ligands, appartenant à la superfamille des récepteurs nucléaires aux hormones (NHR) qui comprend 48 membres codés à la fois chez l'homme et la souris, dont LXR (Liver X Receptor), RXR (Retinoid X Receptor), VDR (Vitamin D Receptor), FXR (Farnesol X Receptor), TR (Thyroid Receptor), et ER (Estrogen Receptor) [238]. Trois isotypes, codés par des gènes différents, PPAR α (NR1C1), PPAR β/δ (NR1C2), et PPAR γ (NR1C3) ont été identifiés. Ces récepteurs possèdent de nombreuses fonctions systémiques et cellulaires qui vont bien souvent au delà des processus qui leur ont donné leur nom.

Les PPARs sont des senseurs capables d'adapter l'induction de l'expression de gènes en fonction des différents signaux lipidiques reçus. La diversité de leurs fonctions est aussi le reflet de la grande diversité de ligands qui peuvent venir se fixer sur ces récepteurs. En effet, les PPARs peuvent être activés par une large palette de ligands naturels synthétisés ou métabolisés. Ces ligands sont des lipides issus de l'alimentation ou de voies de signalisation intracellulaires, qui incluent des acides gras saturés ou insaturés et leurs dérivés tels que les prostaglandines et les leukotriènes [239, 240]. Bien que la plupart des ligands naturels des PPARs se lient à ces récepteurs avec une faible affinité, d'autres ligands endogènes, se liant avec une affinité bien plus importante, commencent à être identifiés [241, 242]. De plus, certains ligands tels que la 15d-PGJ₂ semblent même s'associer de façon irréversible à leur récepteur grâce à des liaisons covalentes [243]. Les ligands des PPARs sont

probablement délivrés dans le noyau cellulaire, où leurs récepteurs résident, grâce à des protéines liant les acides gras (FABPs : Fatty Acid Binding Proteins), qui elles aussi interagissent de façon spécifique avec les trois isoformes de PPARs [244, 245]. Les PPARs constituent des cibles thérapeutiques très importantes, et c'est la raison pour laquelle des ligands synthétiques existent pour chaque isotype différent.

I.2. Structure des PPARs

Les PPARs ont une organisation morphologique conservée parmi la famille des récepteurs nucléaires, composée de cinq domaines principaux (figure 12) [235, 246] :

- Un domaine A/B N-terminal, peu conservé, qui ne semble pas être structuré mais qui possède un domaine de transactivation ligand-dépendant AF-1 ;
- Un domaine C très conservé dans lequel on trouve le DBD (DNA Binding Domain). Ce domaine est caractéristique de la superfamille des récepteurs nucléaires et possède 2 structures en doigts de zinc, dont la première, nommée « P-box », est capable de se lier par sa partie C terminale à des séquences spécifiques nucléotidiques appelées éléments de réponse ou RE (Responsive Element). Sur le second doigt de zinc, la « D-box » est responsable de la dimérisation de PPAR avec un autre récepteur nucléaire, RXR.
- Un domaine D, région charnière qui joue un rôle conformationnel ;
- Un domaine E dans lequel on trouve le LBD (Ligand Binding Domain) qui contient le domaine de transactivation ligand-dépendant AF-2. Le LBD se compose de 12 hélices α et de 4 feuillets β qui forment une poche hydrophobe dans laquelle viennent se loger les ligands [247]. Le domaine E constitue aussi la surface principale disponible pour la fixation des protéines régulatrices des PPARs, appelées co-facteurs ou pour l'éventuelle dimérisation de ce récepteur nucléaire avec RXR;
- Un domaine F carboxy-terminal dont le rôle reste mal connu à ce jour.

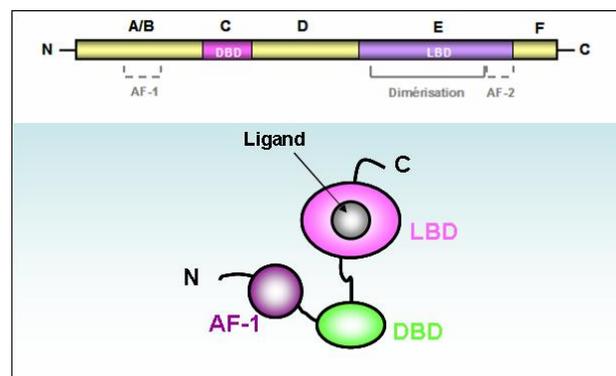


Figure 12 : Structure générale des récepteurs nucléaires PPARs (d'après Mangelsdorf, Cell, 1995 [235], Olefsky, J Biol Chem, 2001 [246] et Glass, J Clin Invest, 2006 [248])

I.3. Hétérodimérisation avec RXR

Contrairement aux récepteurs aux hormones stéroïdes qui agissent en homodimères, les PPARs activent la transcription de leurs gènes cibles en formant un hétérodimère avec RXR (NR2B) [248-250] (figure 13).

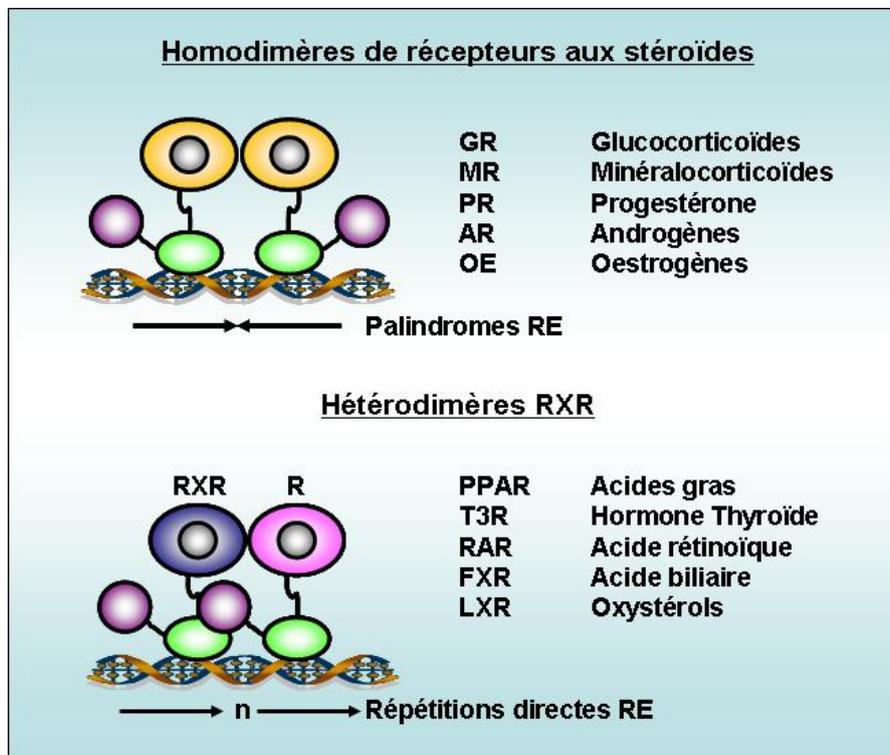


Figure 13 : exemples de dimérisation des récepteurs aux hormones stéroïdes et des PPARs (d'après Glass, J Clin Invest, 2006 [248])

Trois isotypes de RXR peuvent se dimériser avec les PPARs, mais il semble qu'une association spécifique avec un isotype donné favorise la reconnaissance d'un promoteur d'un gène cible donné [251]. En revanche, on ne connaît pas grand chose de l'utilisation de ces isotypes de RXR par les PPARs *in vivo*. Il semblerait que l'association de PPAR avec RXR soit indépendante de la liaison de PPAR à son ligand et de sa liaison à l'ADN [252].

Une fois lié, l'hétérodimère PPAR/RXR active la transcription des gènes cibles en se liant à une séquence nucléotidique spécifique localisée en région 5' de l'ADN cible et nommée PPRE (Peroxisome Proliferator Responsive Element). Contrairement aux éléments de réponse (RE) sur lesquels se fixent les homodimères de récepteurs aux hormones stéroïdes qui se composent de séquences nucléotidiques palindromiques, ces PPRES se composent d'une répétition directe de deux demi séquences consensus AGGTCA, séparées par un nombre n de nucléotides [253]. En général, $n = 1$ pour l'hétérodimère PPAR/RXR [254]. PPAR et RXR se lient respectivement aux extrémités 3' et 5' de ce PPRES [255] et c'est cette dernière région 5' qui contribue à la spécificité de la liaison de l'isotype de PPAR employé [251].

I.4. Les mécanismes d'action des PPARs

I.4.1. Mécanismes de régulation de l'expression des gènes

Des études récentes révèlent l'existence d'une grande diversité de complexes protéiques coactivateurs et corépresseurs capables d'interagir avec les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires et de conditionner leur activité transcriptionnelle [256, 257]. L'identification de ces protéines, l'étude de leurs interactions avec les récepteurs nucléaires qui peuvent mener à une régulation transcriptionnelle positive ou négative selon le ligand fixé, ainsi que leur probable implication dans de nombreux processus de transduction du signal, permet d'envisager ces cofacteurs en tant que cible thérapeutique potentielle dans le traitement de certaines maladies.

I.4.1.1. Mécanismes d'activation de l'expression génique

Globalement, il existe deux principaux modes d'action par lesquels les PPARs peuvent réguler de façon positive l'expression des gènes cibles (figure 14) :

- les PPARs peuvent activer directement la transcription de leurs gènes cibles après hétérodimérisation avec RXR, liaison sur les régions promotrices du gène au niveau d'un PPRE, et recrutement d'un complexe coactivateur dont la nature dépend du ligand fixé par PPAR. Ce complexe coactivateur fonctionne comme un facteur intermédiaire permettant le recrutement de l'ARN polymérase II, nécessaire au processus de transcription [256, 257]. Des études récentes ont montré que de nombreux complexes coactivateurs sont impliqués dans cette activation dépendante du ligand des facteurs de transcription, et que le recrutement de ces complexes au promoteur est un phénomène rapide qui se répète plusieurs fois en une minute. De plus, il semblerait que ces complexes coactivateurs fonctionnent en combinaison entre eux et de façon gène spécifique en intégrant à la fois des informations venant de la liaison de PPAR à l'ADN et des informations provenant des cascades de signalisation déclenchées par les régions régulatrices des gènes à transcrire [248];
- Bien que les PPARs exercent leur activité principalement de façon ligand dépendante, des études récentes ont montré que ces récepteurs possédaient une activité basale importante en absence de ligand exogène. Il semblerait alors que les PPARs soient capables d'être activés de façon indépendante d'un ligand, ou plutôt en présence de très faibles concentrations d'un ligand endogène. Mais la question reste en suspens puisque des études récentes ont pu démontrer que cette activité basale des PPARs seraient en fait liée aux régions AF-1 et AF-2, responsables de la fixation des PPARs à l'ADN et même de la dimérisation avec RXR en absence de ligand [258].

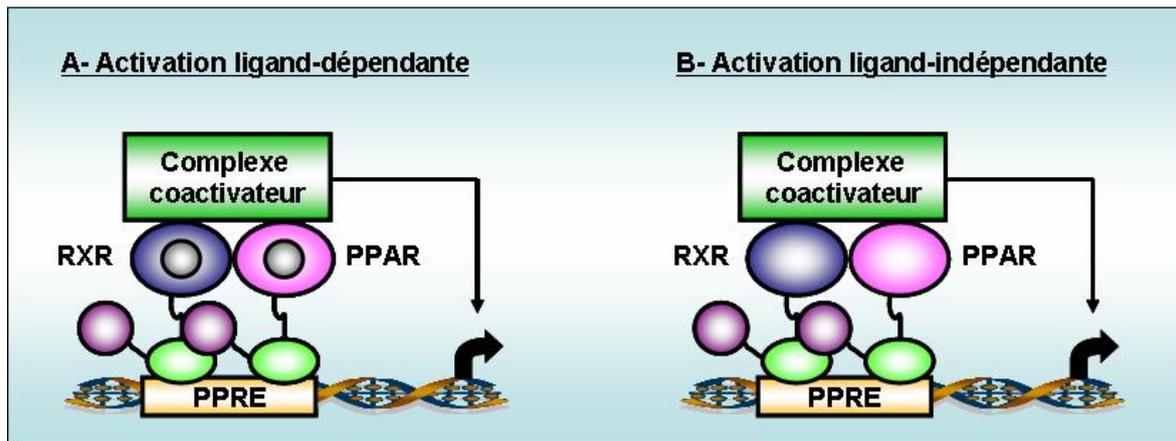


Figure 14 : Mécanisme d'activation transcriptionnelle de l'expression génique (d'après Glass, J Clin Invest, 2006 [248])

1.4.1.2. Mécanismes de répression de l'expression génique

Globalement, il existe de nombreux mécanismes par lesquels les PPARs peuvent réguler négativement l'expression des gènes. Ces mécanismes peuvent être dépendants ou indépendants de la fixation à l'ADN et de la présence de ligand.

Tout d'abord, les PPARs peuvent se lier à des gènes cibles en absence de ligand et ainsi inhiber activement leur transcription. Cette fonction de répression résulte du recrutement de complexes corépresseurs qui agissent de façon opposée aux complexes coactivateurs [259]. En présence d'un ligand activateur, le complexe corépresseur est remplacé par un complexe coactivateur, ce qui va entraîner la transduction du gène. Cet échange de complexes antagonistes constitue une cible privilégiée pour des molécules synthétiques capables de réguler l'activité des facteurs de transcription tels que les PPARs. Ainsi, des agonistes de ces récepteurs nucléaires fonctionnent comme de véritables hormones et favorisent la fixation d'un complexe coactivateur. Au contraire, certains antagonistes des PPARs permettent d'inhiber le recrutement des complexes activateurs, et, dans la plupart des cas, favorisent même la fixation d'un complexe corépresseur verrouillant la transcription du gène [260]. Ces propriétés reflètent la grande complexité des fonctions des récepteurs nucléaires en général.

De plus, les PPARs peuvent avoir des effets inhibiteurs indirects sur l'activité transcriptionnelle d'autres facteurs de transcription (figure 15). Ce phénomène, nommé *trans*-répression, peut se faire par l'inhibition de la liaison du facteur de transcription réprimé à l'ADN de son gène cible grâce à des interactions directes protéine / protéine avec les PPARs, ou encore par séquestration des cofacteurs nécessaires à l'activation de ce facteur de transcription [258]. Cette activité est spécifique d'un promoteur, mais semble être indépendante de la liaison du récepteur nucléaire à l'ADN. Le phénomène de *trans*-répression est déclenché en particulier par les glucocorticoïdes synthétiques,

tels que la dexaméthasone, utilisés en clinique pour leur rôle anti-inflammatoire [261], mais c'est aussi par cette voie que les agonistes des PPARs pourraient exercer leurs effets thérapeutiques [262].

Parmi les mécanismes de *trans*-répressions indépendantes de la liaison à l'ADN, citons :

- l'interaction directe entre PPAR et le facteur de transcription réprimé, aboutissant à la séquestration dans le cytoplasme de cette protéine, et donc à l'inhibition de la transcription de son gène cible. Ce mécanisme a été décrit pour la régulation négative du promoteur à l'IL-2 par PPAR γ via la séquestration de du facteur de transcription NFAT [263] ;
- la séquestration par les hétérodimères PPAR/RXR des coactivateurs nécessaires à l'activation de la transcription d'un gène cible. Ainsi, un phénomène de compétition peut s'installer lorsque les PPARs sont plus affins pour les complexes coactivateurs que le facteur de transcription du gène cible, entraînant la répression de la transcription de ce dernier. A l'inverse, le relargage de complexes corépresseurs par les PPARs peut inhiber l'activité transcriptionnelle du facteur de transcription alors réprimé.

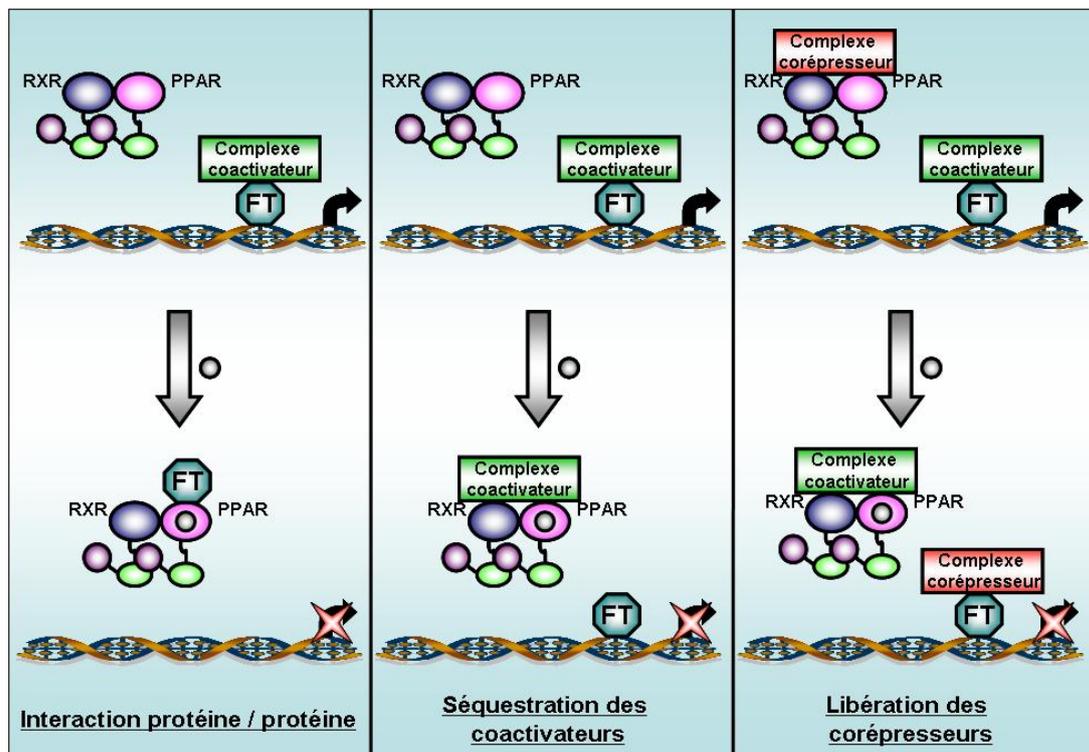


Figure 15 : Mécanismes de *trans*-répression de l'expression génique (d'après Feige, Prog Lipid Res, 2006 [258])

1.4.2. Modulation de l'activité transcriptionnelle des PPARs

Certaines modifications des PPARs peuvent entraîner la modulation de leur activité transcriptionnelle. A ce jour, trois types de modifications sont décrites.

1.4.2.1. La phosphorylation des PPARs

De nombreuses cascades de signalisation intracellulaires telles que celles déclenchées par les MAPK (Mitogen-Associated Protein Kinase) ou encore par les PKA ou PKC (Protein Kinases A ou C) sont capables de moduler l'activité transcriptionnelle des PPARs par phosphorylation de ces récepteurs nucléaires. Ainsi, de nombreux sites de phosphorylation ont pu être mis en évidence tout le long de la structure de ces facteurs de transcription [264, 265]. La phosphorylation des PPARs entraîne de profondes modifications conformationnelles qui se traduisent par des changements de l'affinité de ces récepteurs nucléaires pour leurs propres ligands, pour RXR, pour leurs cofacteurs et même pour leurs gènes cibles. De plus, les effets de la phosphorylation dépendent de l'isotype de PPAR, de la nature des résidus phosphorylés, de la kinase mise en jeu, du promoteur du gène ciblé et du type cellulaire considéré [264].

Mais en plus de ces effets directs de la phosphorylation, l'activité des PPARs peut aussi être modulée par des changements de niveau d'expression de ces récepteurs. Par exemple, la PKC induit l'expression de PPAR α et les kinases de stress associées à cette PKC sont capables d'induire l'expression de PPAR β [266, 267]. Parmi les autres régulations indirectes de l'activité des PPARs, citons la phosphorylation possible de RXR et de la plupart des cofacteurs associés.

1.4.2.2. L'ubiquitylation des PPARs

L'ubiquitine est une protéine qui se lie de façon covalente à d'autres protéines dans le but de les diriger vers le protéasome 26S où ces dernières seront dégradées. L'ubiquitylation des PPARs se fait au niveau de résidus lysine et requiert l'activation d'une cascade enzymatique multifactorielle qui aboutit à l'ajout de l'ubiquitine par une ubiquitine-ligase. Le processus de dégradation de PPAR γ est déclenché par la liaison d'un de ses ligands via un mécanisme qui requiert l'activation du domaine AF-2 ainsi qu'une conformation particulière de ce récepteur [268]. De façon intéressante, de nombreux cofacteurs tels que p300 peuvent posséder une activité ubiquitine-ligase [269]. A l'inverse, de nombreuses enzymes participant à l'ubiquitylation peuvent être recrutées par le récepteur nucléaire au cours de l'activation transcriptionnelle de son gène cible [270, 271].

1.4.2.3. La SUMOylation des PPARs

Les protéines SUMOs (Small Ubiquitin-like MODifiers) composent une famille de trois membres homologues de l'ubiquitine, qui peuvent être conjuguées à des récepteurs nucléaires par des liaisons covalentes réversibles, de façon à réguler de nombreux processus cellulaires, et notamment le contrôle négatif de la transcription des gènes [272]. La SUMOylation se fait sur des résidus lysine (K)

et le transfert de ces protéines SUMOs est réalisé par l'action coordonnée de nombreuses enzymes spécifiques et communes avec les enzymes d'ubiquitylation.

PPAR γ peut être SUMOylé au niveau de ses lysines 77 et 365. La SUMOylation de K77 est dépendante du ligand et régule de façon négative l'activité transcriptionnelle du récepteur nucléaire [262, 273, 274]. En revanche, la SUMOylation de K365 est indépendante du ligand et conduit à des effets *trans*-répresseurs complexes au niveau du promoteur de la iNOS en favorisant des interactions avec NCoR [262]. Les mécanismes moléculaires contrôlant cette SUMOylation font intervenir une interaction indépendante du ligand entre PPAR γ et PIAS1 (Protein Inhibitor of Activated Stat1), une SUMO-ligase. Dans ce modèle, la liaison d'un ligand (rosiglitazone), induit un changement conformationnel qui oriente K365 vers l'extérieur du LBD facilitant ainsi l'accès à PIAS1 qui peut alors exercer son activité SUMO-ligase sur ce résidu [262] (figure 16). En revanche, PIAS1 peut aussi avoir une activité activatrice dépendante du ligand sur les récepteurs nucléaires tels que PPAR γ [273, 274]. Au bilan, PIAS peut exercer deux actions sur PPAR γ en favorisant la *trans*-répression *via* la SUMOylation de K365, ou en agissant comme un coactivateur de PPAR γ certainement en promouvant la SUMOylation d'autres cofacteurs ou des histones. Ces modèles apparemment contradictoires pourraient expliquer le rôle positif ou négatif de PPAR γ sur la transcription de gènes selon l'état de préactivation de la cellule, selon la nature des cofacteurs présents sur le promoteur du gène au moment du traitement par les ligands de PPAR γ , mais aussi selon l'état basal de SUMOylation de PPAR γ avant la fixation de l'agoniste. De plus, cette dichotomie de l'effet de la SUMOylation de PPAR γ pourrait expliquer la régulation biphasique de nombreux gènes lors de la réaction inflammatoire dans laquelle PPAR γ joue un rôle primordial.

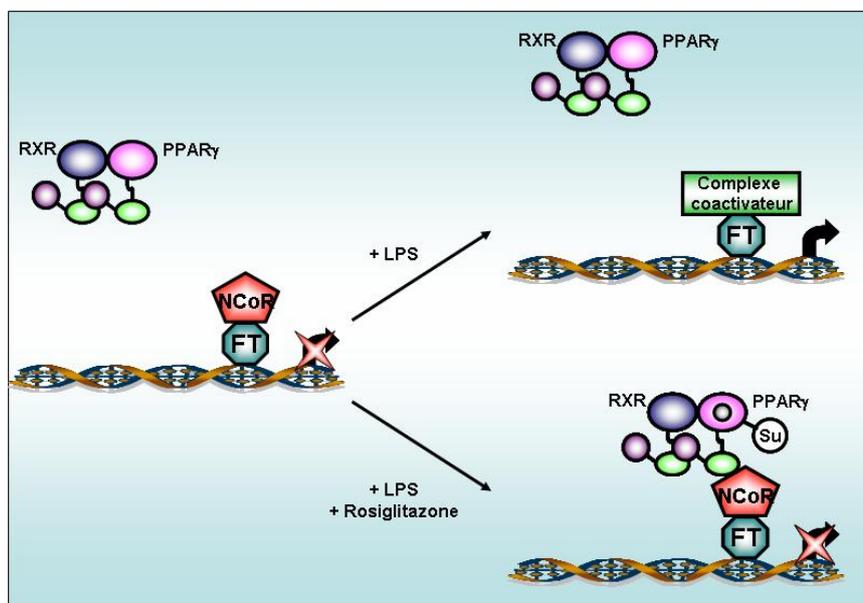


Figure 16 : Modèle de *trans*-répression de l'activité d'un facteur de transcription par SUMOylation de PPAR γ

(d'après Feige, Prog Lipid Res, 2006 [258])

1.4.3. Les cofacteurs

Les cofacteurs sont des protéines capables d'activer (coactivateurs) ou de réprimer (corépresseurs) l'activité transcriptionnelle d'un récepteur nucléaire en reliant le facteur de transcription à sa machinerie transcriptionnelle, ou en provoquant des modifications spécifiques dans la structure de la chromatine. En effet, la compaction de la chromatine et l'hypoacétylation des histones sont connus pour empêcher l'expression des gènes. De plus, le remodelage de la chromatine et le repositionnement des nucléosomes est un phénomène nécessaire à la fixation du facteur de transcription sur l'ADN et à la formation d'un complexe d'initiation de la transcription.

1.4.3.1. Les coactivateurs

Les coactivateurs des récepteurs nucléaires tels que les PPARs favorisent la transcription des gènes cibles. Parmi ces molécules, SRC-1 (NCoA-1) [275, 276], SRC-2 (GRIP-1/TIF2) [277, 278], et SRC-3 (p/CIP/RAC3/ACTR/AIB-1/TRAM-1) [279-283] appartiennent à la famille SRC/p160. La caractérisation de ces 3 membres en tant que coactivateurs est basée sur leur localisation intranucléaire, leur capacité à interagir avec les récepteurs nucléaires et à amplifier leur fonction de transactivation ligand dépendante [275]. Les protéines appartenant à la famille SRC/p160 sont fonctionnellement et structurellement différentes des autres protéines classées parmi les coactivateurs telles que les protéines CBP (acétyltransférases) [276] et p300 [284], les membres du complexe TRAP/DRIP [285, 286], les ubiquitines-ligases E6-AP [287], les complexes SWI/SNF (SWI/Itch/ Sucrose Non Fermenting) remodelant la chromatine [288, 289], les coactivateurs ARN SRA [290], les protéines méthyltransférases CARM-1 et PRMT-1 [291, 292], et les membres de la machinerie transcriptionnelle TBP et TAFs [293]. Cependant, toutes ces protéines partagent une caractéristique structurale qui est la présence d'une boîte NR composée d'un motif LXXLL en hélice α [294], présent en un ou plusieurs exemplaires selon le coactivateur considéré, et impliqué dans leur recrutement ligand dépendant par le domaine LBD activé (AF-2) des récepteurs nucléaires. De plus, certaines propriétés fonctionnelles sont communes à plusieurs coactivateurs. Par exemple, l'activité acétyltransférase qui cible les histones ainsi que d'autres protéines de façon à rendre l'ADN permissif à la fixation des complexes sur les régions promotrices est partagée par CBP [295], PCAF [296] et les protéines SRC [281, 297].

1.4.3.2. Les corépresseurs des récepteurs nucléaires

De la même façon que les coactivateurs, les corépresseurs tels que NCoR [298] et SMRT (Silencing Mediator of Retinoid and Thyroid receptors) [299] sont recrutés par les récepteurs nucléaires en absence de ligand ou en présence d'antagonistes de ces facteurs de transcription. La reconnaissance de ces corépresseurs par des récepteurs nucléaires transcriptionnellement inertes se fait par des peptides hélicoïdaux nommés « boîtes CoRNR » [300], qui sont très similaires aux boîtes NR des coactivateurs. En plus de leurs similitudes structurales, les corépresseurs partagent avec les coactivateurs certaines de leurs propriétés fonctionnelles. Par exemple, la déacétylation des histones par les corépresseurs semble antagoniser l'activité acétyltransférase des coactivateurs. Ce

phénomène requiert le recrutement d'autres facteurs tels que Sin3 ou des déacétylases (HDACs) [301] par les corépresseurs qui ne possèdent pas de domaines intrinsèques permettant la déacétylation.

1.4.3.3. L'échange entre les corépresseurs et les coactivateurs

Des facteurs protéiques d'échange des corépresseurs nucléaires (NCoEx) ont récemment été identifiés. Ces protéines échangeuses sont capables de s'associer avec les récepteurs nucléaires et de faciliter la transition d'un état réprimé à un état transcriptionnellement actif en réalisant l'échange entre un complexe corépresseur et un complexe coactivateur [302]. Ainsi, les protéines TBL1 (Transducin β -like 1) et TBLR1 sont associées à ces complexes corépresseurs / coactivateurs et servent de molécules adaptatrices pour le recrutement de la machinerie d'ubiquitylation [303]. De même, ces deux protéines sont essentielles à l'induction de l'activité de PPAR γ par la rosiglitazone. TBLR1 induit le décrochement de NCoR du complexe lié au promoteur du gène cible, certainement en l'envoyant dans la voie de dégradation par le protéasome (figure 17). Le mode d'action de TBL1 quant à lui reste beaucoup moins clair : cette protéine échangeuse pourrait entraîner la dégradation d'autres corépresseurs que NCoR et pourrait ainsi agir en modifiant l'équilibre entre les coactivateurs et les corépresseurs [258].

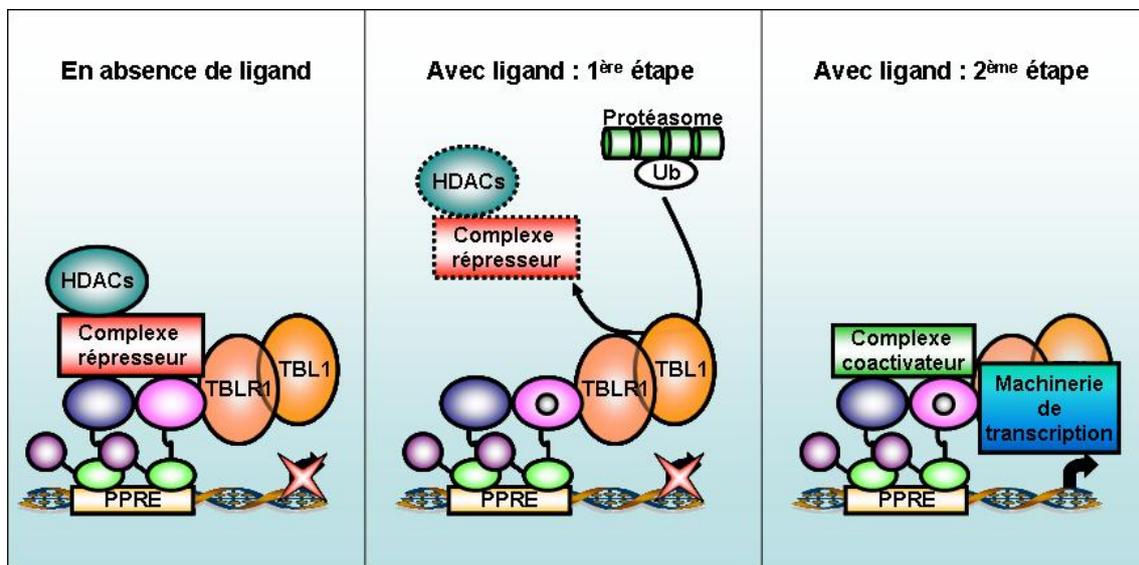


Figure 17 : échange dépendant du ligand des complexes corépresseurs et coactivateur (d'après Feige, Prog Lipid Res, 2006 [258])

I.5. Les différents isotypes de PPARs : répartitions tissulaires et rôles

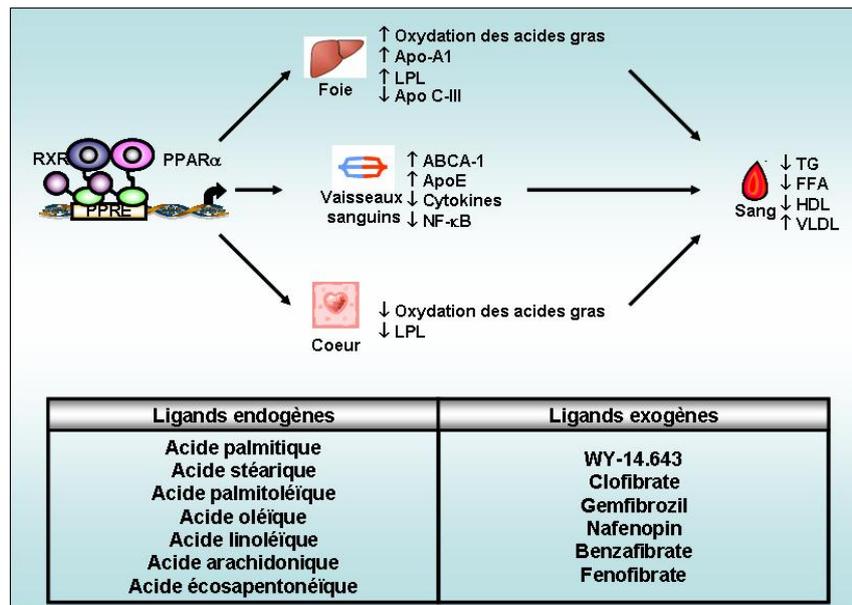
I.5.1. PPAR α

PPAR α est un récepteur nucléaire exprimé chez les rongeurs et chez l'homme dans de nombreux tissus tels que le foie, les reins, le cœur, les muscles squelettiques et le tissu brun adipeux [304, 305], ainsi que dans une grande variété de cellules vasculaires telles que les cellules endothéliales [306], les cellules musculaires lisses des vaisseaux sanguins (VSMCs) [307, 308] et les monocytes / macrophages [309]. Les ligands de PPAR α sont les fibrates. PPAR α activé joue un rôle majeur dans le métabolisme lipidique, l'inflammation et l'athérosclérose (figure 18).

Ainsi, les agonistes de PPAR α sont impliqués dans la β -oxydation des acides gras, et stimulent la capture de ces derniers par les cellules en augmentant l'expression des protéines transporteuses FATP et FAT (Fatty Acid Translocases) à leur surface [310]. Les ligands exogènes de PPAR α tels que les fibrates ou d'autres agents augmentent l'expression du cytochrome P4054A (CYP4A), capable de catalyser la ω -hydroxylation des acides gras [311]. Ces mécanismes sont impliqués dans la réduction de la production des triglycérides (TGs). PPAR α contrôle aussi la synthèse de ces TGs en amplifiant l'expression de lipases lipoprotéiques (LPL) [312] et en inhibant l'adipolipoprotéine (Apo) C-III dans le foie [313]. Dans le cœur, PPAR α fournit le myocarde en énergie en régulant l'expression de gènes impliqués dans la captation et l'oxydation des acides gras [314].

En plus de ces fonctions, il a été montré que les agonistes de PPAR α augmentent l'expression de l'adipolipoprotéine A-1 (Apo A-1) [315] qui est une HDL (High-Density Lipoprotein) impliquée dans le transport inverse du cholestérol (RCT) des cellules périphériques. Dans cette même voie RCT, PPAR α augmente aussi l'expression de ABCA1 (ATP Binding Cassette A-1) qui favorise l'efflux de cholestérol dans les macrophages [316]. Certaines études montrent que PPAR α favorise l'expression de ABCA-1 en augmentant l'expression de LXR- α (Liver X receptor) [317]. Ainsi, ces deux récepteurs nucléaires pourraient avoir des effets bénéfiques sur les lésions d'athérosclérose.

Les ligands de PPAR α exercent aussi des effets anti-inflammatoires sur les cellules vasculaires. Ces effets incluent l'inhibition de l'expression de VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule-1) [318] et l'augmentation de la NOS endothéliale (eNOS) [319]. Au niveau des cellules endothéliales, les agonistes de PPAR α réduisent les concentrations d'IL-6 et diminuent l'expression de COX-2 dans les VSMCs en réprimant NF- κ B [308]. Enfin, PPAR α induit aussi l'apoptose [309] et diminue l'expression du facteur tissulaire (TF) et de la métalloprotéinase (MMP) dans les macrophages activés [320, 321].

Figure 18 : Ligands et effets biologiques de PPAR α

1.5.2. PPAR β/δ

PPAR β/δ est un récepteur nucléaire exprimé dans de nombreux tissus et en particulier dans ce cerveau, le tissu ou la peau [240, 304]. Les fonctions de PPAR β/δ sont essentielles au bon fonctionnement de l'organisme puisque ce dernier joue un rôle très important dans l'inflammation, l'athérosclérose, l'obésité, la fertilité, le cancer et le système nerveux (figure 19).

Ainsi, des effets bénéfiques des agonistes de PPAR β/δ ont pu être observés dans de nombreuses pathologies, et notamment dans le contrôle de l'hyperlipidémie, de l'athérosclérose, de l'efflux du cholestérol et dans l'apport d'énergie au niveau des muscles [322, 323]. De plus, des données récentes sur le remplissage des kératinocytes en lipides au cours de leur différenciation soulignent le rôle de PPAR β/δ dans l'inflammation [324]. L'activation de PPAR β/δ par des agonistes spécifiques entraîne d'une part une diminution des taux de TGs et de glucose sanguin dans des modèles animaux de diabète de type 2 [325], et d'autre part augmente l'expression d'enzymes contrôlant l'obésité telles que UCP1 et UCP3 dans le tissu adipeux brun, et UCP2 dans le muscle [326].

PPAR β/δ peut aussi jouer un rôle dans la grossesse, en influençant par exemple l'implantation du fœtus, et dans la mise en place des annexes telles que le placenta. Il a ainsi été montré chez la souris que PPAR β/δ et COX-2 étaient très fortement exprimés au niveau des sites d'implantation de l'utérus et que leur expression augmente de façon considérable au cours du développement du réseau placentaire [327]. En absence de COX-2, le L-165041, agoniste spécifique de PPAR β/δ , est capable à lui seul de restaurer le processus d'implantation du fœtus [327]. Enfin, d'autres équipes ont montré

chez le rat une sur-expression de PPAR β/δ au niveau du site d'implantation foetal et des cellules du placenta [328], ce qui renforce l'idée du rôle de ce récepteur nucléaire dans la grossesse.

Le rôle de PPAR β/δ dans le cancer a été suggéré car il a été démontré que ce récepteur nucléaire pouvait être impliqué dans le développement de tumeurs gastro-intestinales [329], du colon et du rectum [330], et dans la prolifération de polypes. En revanche, une étude plus récente montre au contraire que PPAR β/δ peut avoir des effets atténuateurs sur la carcinogenèse du colon [331], ce qui suggère que le rôle de PPAR β/δ dans le cancer a besoin d'être clarifié.

PPAR β/δ est très fortement exprimé tout le long du système nerveux central, et particulièrement au niveau du cortex frontal, des ganglions basaux, de la formation réticulaire, des noyaux centraux, des noyaux cérébelleux profonds, des cellules de Golgi cérébelleuses et des noyaux thalamiques [332, 333]. Des agonistes de PPAR β/δ sont capables d'augmenter la différenciation des oligodendrocytes ce qui suggère l'implication de ce récepteur nucléaire dans la myélinisation des axones et dans la modulation des réponses aux sensations de douleur et de chaleur [334]. Il a aussi été montré que PPAR β/δ jouait un rôle primordial dans le métabolisme lipidique au niveau du cerveau [335] et dans la protection des cellules nerveuses au cours des processus de neurodégénérescence [336].

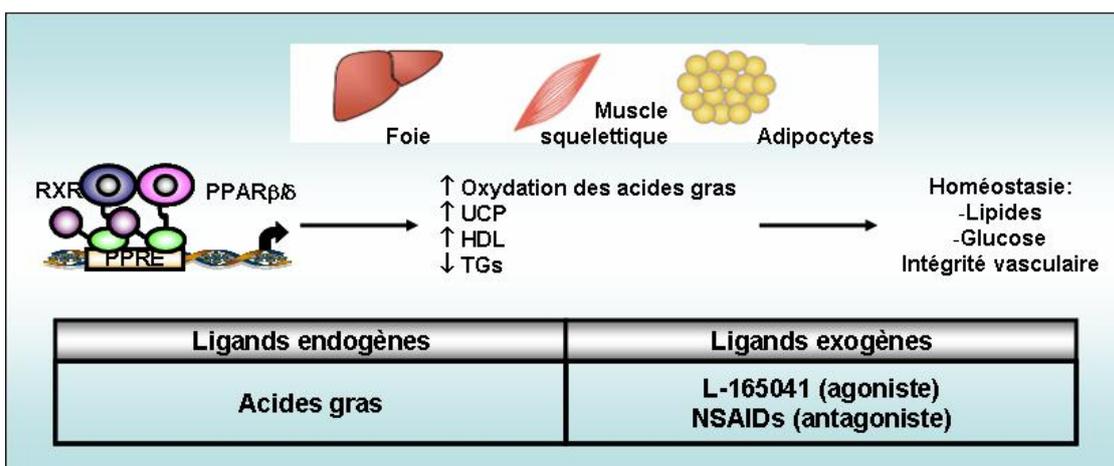


Figure 19 : Ligands et effets biologiques de PPAR β/δ

1.5.3. PPAR γ

Le gène de PPAR γ contient trois promoteurs qui induisent la transcription de trois isoformes différentes nommées PPAR γ 1, PPAR γ 2 [337] et PPAR γ 3 [338]. Ce sont les transcrits de PPAR γ 1 et PPAR γ 3 qui sont par la suite traduits pour former la protéine PPAR γ 1. L'expression de PPAR γ est dépendante du tissu considéré. Ainsi, PPAR γ 1 est présent dans de nombreux tissus alors que PPAR γ 2 est restreint au niveau du tissu adipeux. PPAR γ 3 est très abondant dans les macrophages, le

gros intestin ainsi que dans le tissu blanc adipeux [304, 338, 339]. PPAR γ joue un rôle très important dans la différenciation des adipocytes, dans la sensibilisation à l'insuline, dans le cancer, dans l'inflammation et l'athérosclérose, dans les désordres rétinien, et dans la résistance immunitaire (figure 20).

1.5.3.1. Les ligands endogènes de PPAR γ

Les ligands endogènes de PPAR γ sont des acides gras poly-insaturés tels que l'acide linoléique, l'acide arachidonique et les acides eicosapentaénoïques. Les prostaglandines (PGs) telles que la 15-deoxy- Δ^{12-14} PGJ₂ (15d-PGJ₂), métabolite de la PGD₂, ont été identifiées comme de puissants agonistes de PPAR γ [340]. Au laboratoire, il a été montré que l'IL-13 induit la formation de 15d-PGJ₂ par l'activation d'une cPLA₂, aboutissant à l'activation de PPAR- γ , à l'augmentation de l'expression des récepteurs CD36 et mannose des macrophages, et à l'élimination de parasites tels que *Candida albicans* [115] et *Plasmodium falciparum* [116]. D'autres lipides oxydés tels que le 9-HODE ou le 15-HETE, produits respectivement par des cyclooxygénases et des lipoxygénases, ont aussi été décrits comme des activateurs de PPAR γ dans des cellules humaines primaires telles que les macrophages [341].

1.5.3.2. Les ligands exogènes de PPAR γ

Les thiazolidinediones (TZDs : rosiglitazone, troglitazone, ciglitazone, pioglitazone...) sont des composés synthétiques capables d'activer le récepteur nucléaire PPAR γ , et ainsi d'augmenter la résistance à l'insuline et de diminuer les taux de glucose sanguin dans le diabète de type 2. La plupart des TZDs sont spécifiques de PPAR γ et n'activent que très faiblement PPAR α ou PPAR β/δ [342]. Les isoxazolidinediones sont des agonistes de PPAR γ n'appartenant pas à la famille des TZDs. Parmi ces molécules, le JTT-501 peut agir aussi sur PPAR α à très forte concentration [343] alors que le GW-7845 active PPAR γ uniquement et confère des propriétés anti-diabétiques et anti-carcinogène chez les rongeurs [344, 345].

Ces dernières années, de nombreuses molécules agonistes ou antagonistes partiels ont été identifiées. Ainsi, le CDDO (Triterpénoïde 2-cyano-3,12-dioxooleana-1,9-dien-28-oïque acid) est un agoniste partiel qui confère à PPAR γ des propriétés anti-inflammatoires [346], alors que le BADGE (bisphénol diglycidyl ether) [347] et le LG-100641 [348] sont des antagonistes de PPAR γ . Mais les composés synthétiques chimiques ne sont pas les seuls à posséder la capacité à activer PPAR γ . En effet, des agonistes de ce récepteur nucléaire ont été découverts dans la composition de certaines plantes médicinales (Saururane A extrait de *Saururus chinensis* [349], composés phénoliques extraits de *Glycyrrhiza uralensis* [350]...).

1.5.3.3. Les effets biologiques de PPAR γ

L'adipogenèse est un processus de différenciation des pré-adipocytes en adipocytes capables de se remplir de lipides et de sécréter des hormones et des cytokines. PPAR γ est un facteur de transcription important impliqué dans les processus de croissance cellulaire et d'arrêt de la différenciation selon la

progression de l'adipocyte dans son programme de spécialisation [351, 352]. En plus de stimuler la différenciation des adipocytes, PPAR γ est impliqué dans l'apoptose des adipocytes matures remplis de lipides [353], ce qui a pour conséquence d'intensifier la stimulation des pré-adipocytes qui vont s'engager dans la voie de différenciation [353, 354].

PPAR γ est très fortement exprimé dans les cellules endothéliales, dans les cellules vasculaires du muscle lisse (VSMCs) et dans les macrophages, ce qui suggère ses propriétés anti-inflammatoires ainsi que son rôle dans le métabolisme lipidique. Par conséquent, les fonctions de PPAR γ ont été étudiées dans des pathologies présentant des désordres inflammatoires chroniques telles que l'athérosclérose, l'arthrite et le syndrome inflammatoire de l'intestin. Ainsi, il a été montré que les agonistes de PPAR γ protégeaient les animaux de l'athérosclérose.

En revanche, ces mêmes agonistes peuvent entraîner des effets délétères en augmentant l'expression du récepteur scavenger CD36, responsable de la capture des LDL oxydées, et en favorisant ainsi le développement de macrophages spumeux [355]. De plus, les TZDs peuvent inhiber l'expression de VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) et de ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule 1) dans les cellules endothéliales, réduisant ainsi l'accumulation des monocytes au niveau de l'intima artérielle [356]. Dans le macrophage humain, PPAR γ inhibe l'activité de MMP-9 responsable de la rupture de la plaque d'athérome [357].

Les VSMCs jouent un rôle primordial dans la progression de l'athérosclérose et sont des cibles privilégiées pour les agonistes de PPAR γ . Ainsi, les TZDs inhibent leur prolifération en diminuant la phosphorylation des protéines du rétinoblastome et en augmentant les taux de p27, un inhibiteur dépendant des cyclines [358]. De plus, les ligands de PPAR γ inhibent l'expression et l'activité de la MMP-9 et empêchent la migration des VSMCs ce qui diminue l'activité pro-athérogénique de PPAR γ [357]. Enfin, les ligands de PPAR γ inhibent l'expression du récepteur à l'angiotensine II dans les VSMCs ce qui est bénéfique en cas d'athérosclérose ou d'hypertension [359].

Les agonistes de PPAR γ jouent aussi un rôle très important dans le métabolisme lipidique des macrophages en induisant l'expression de certains gènes clés tels que ABCA1, ABCG1, l'apolipoprotéine E (ApoE) et SR-B1 [360-362].

PPAR γ a aussi été impliqué dans les processus de sensibilisation à l'insuline. Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire exprimée par les adipocytes et associée au phénomène de résistance à l'insuline. Il a été montré *in vivo* que les TZDs augmentaient la résistance à l'insuline des adipocytes murins en s'opposant aux effets du TNF- α [363]. Il a aussi été montré que l'expression de GLUT-4, une protéine permettant le transport du glucose, était augmentée au niveau des adipocytes chez le rat en réponse à un analogue des TZDs [364]. En revanche, il a été montré que la troglitazone ainsi que le TNF- α entraînaient une diminution des taux sanguins de résistine, une hormone sécrétée par les adipocytes qui augmente la glycémie [365]. D'autres facteurs sécrétés par les adipocytes et jouant un rôle dans le métabolisme du glucose dépendent de l'activation de PPAR γ . Plusieurs études *in vivo* ont démontré que la troglitazone augmentait la distribution du glucose aux muscles squelettiques en stimulant l'insuline, l'activité de la PI3K et la phosphorylation des kinases membranaires PKB/Akt

[366]. Ces données sont à prendre avec précaution car comme PPAR γ est plus exprimé dans le tissu adipeux que dans le tissu musculaire, des effets directs de ce récepteur nucléaire restent à démontrer.

Les souris déficientes en PPAR γ présentent des taux basaux de glucose et de FFA (Free Fatty Acids) normaux. Ceci suggère que PPAR γ pourrait supprimer les effets de l'insuline et entraîner la résistance en interagissant avec ses corépresseurs en absence de ligand. Il est donc possible que les TZDs entraînent une résistance à l'insuline en chassant les corépresseurs de l'hétérodimère PPAR γ /RXR [367]. Ces résultats indiquent qu'il reste beaucoup de choses à éclaircir à propos de l'action de ces récepteurs nucléaires dans le phénomène de résistance à l'insuline et dans les pathologies associées.

PPAR γ joue aussi un rôle important dans le cancer. En effet, ses propriétés d'apoptose de différenciation cellulaire sont bénéfiques dans le traitement des tumeurs du sein, du colon, de la prostate, du pancréas, de la vésicule biliaire, et gastrique par chimiothérapie. Ainsi, la troglitazone induit la différenciation terminale adipocytaire et diminue la prolifération cellulaire chez les patients traités [368].

Les effets des ligands de PPAR γ ont aussi pu être observés dans l'amélioration des problèmes rétiens liés à l'âge et au diabète. En effet, la troglitazone inhibe la synthèse de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) par les pigments rétiens et les cellules épithéliales angiogéniques de la choroïde [369]. De plus, les TZDs jouent un rôle anti-oxydant au niveau des cellules ganglionnaires de la rétine [370]. Ces effets suggèrent le rôle de PPAR γ dans la résolution des désordres rétiens.

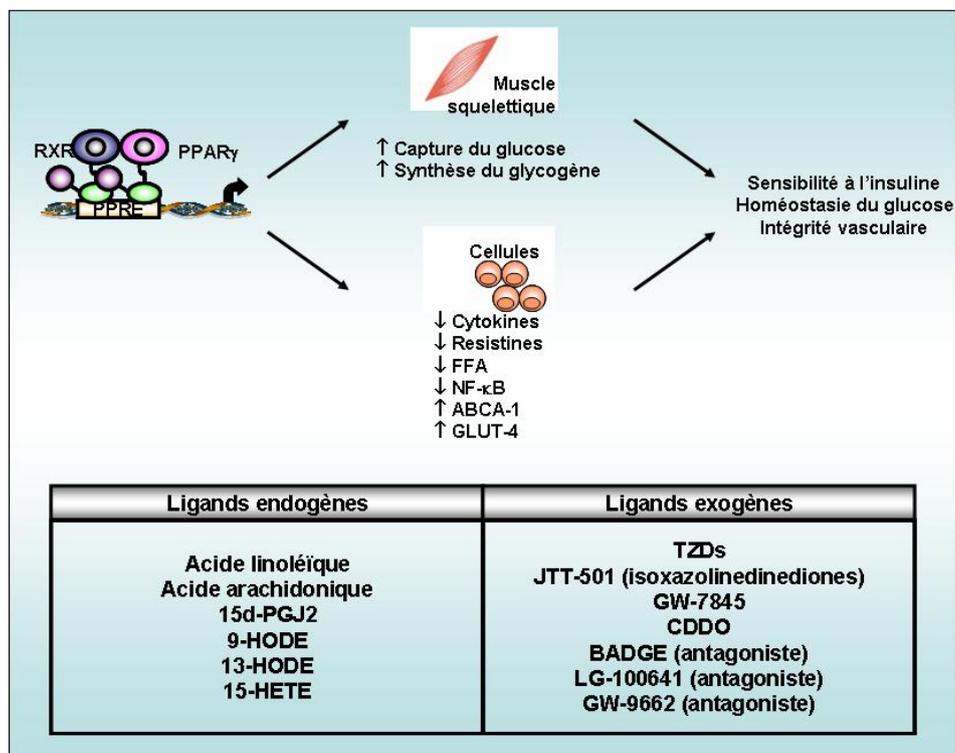


Figure 20 : ligands et effets biologiques de PPAR γ

II. Rôle de PPAR γ dans la défense immunitaire

II.1. Rôle de PPAR γ dans la polarisation des cellules immunitaires

PPAR γ et ses ligands jouent un rôle très important dans la régulation de la différenciation et du développement des cellules immunitaires telles que les monocytes / macrophages, les cellules T et les cellules NK [371]. Ainsi, la production d'IFN- γ par les cellules T et les NK peut être inhibée à la fois par des ligands endogènes ou synthétiques de PPAR γ , et ce par des voies dépendantes ou indépendantes de PPAR γ [372, 373]. Ceci suggère que ce récepteur et ses ligands, dont les acides gras poly-insaturés et les eicosanoïdes, peuvent avoir un impact significatif sur la balance Th1 / Th2 de la réponse immunitaire. De plus, il a été montré que l'expression de PPAR γ était beaucoup plus forte dans les cellules T orientées Th2 que dans celles orientées Th1 [374]. Cela est également vérifié pour les cellules NK cultivées en conditions Th2 [372]. Mais l'expression de PPAR γ peut aussi être régulée par l'IFN- γ . En effet, dans les adipocytes, l'IFN- γ entraîne la dégradation de PPAR γ *via* la voie de l'ubiquitine et du protéasome [375]. Un tel mécanisme pourrait s'appliquer à toutes les cellules du système immunitaire.

De façon intéressante, la PGD₂, précurseur de la 15d-PGJ₂ [376], le CRTH2, récepteur membranaire de son métabolite [377-379], ainsi qu'un certain type de PLA₂ [380] et d'enzymes de synthèse des prostaglandines, s'expriment préférentiellement dans des cellules T CD4⁺ orientées Th2 plutôt que dans les cellules Th1.

La contribution des eicosanoïdes à la différenciation des cellules Th2 est supportée par le fait que les cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse sont capables de produire la PGE₂. Cette dernière favorise la production d'IL-10 par ces DC au cours de la présentation d'antigène, tout en réprimant la production d'IL-12, cytokine Th1 [228]. De la même façon, l'activation de PPAR γ par ses ligands inhibe la production d'IL-12 par les DC dérivées des monocytes humains [381]. Par ces mécanismes, PPAR γ pourrait être un facteur de transcription impliqué dans la polarisation des cellules du système immunitaire.

II.2. Rôle de PPAR γ dans la réponse anti-infectieuse

L'implication de PPAR γ dans la réponse anti-infectieuse est un phénomène qui n'est pas très bien documenté à ce jour. Seules quelques études ayant caractérisé les propriétés anti-infectieuses de PPAR γ dans les cellules immunitaires telles que les lymphocytes T et B, les monocytes et les macrophages, les cellules dendritiques et les granulocytes ont fait le rapprochement de la possibilité de l'implication de ce récepteur nucléaire dans les processus de défense de l'hôte.

Le rôle de PPAR γ dans la réponse immunitaire a été étudié en particulier chez les macrophages dans notre laboratoire. Ainsi, Coste et al. ont démontré que l'activation de PPAR γ *in vitro* par des ligands tels que la 15d-PGJ₂ ou la rosiglitazone, ou encore par des cytokines Th2 telles que l'IL-4 ou l'IL-13 entraînait une diminution de la prolifération de *Candida albicans* dans le macrophage murin [115]. Cette étude a pour la première fois mis en évidence la néo-synthèse de 15d-PGJ₂ en réponse à la

stimulation des macrophages par les cytokines Th2 via l'activation d'une cPLA₂. Ce ligand ainsi produit est capable, comme les TZDs exogènes, d'activer le récepteur nucléaire PPAR γ qui va favoriser l'expression des récepteurs mannose à la surface des macrophages, ainsi que l'augmentation des fonctions anti-infectieuses telles que la synthèse d'agents oxydants et la phagocytose. L'ensemble de ces événements conduit à l'élimination de *Candida albicans in vitro* [115] (figure 21).

Notre travail se positionne dans la continuité de ces résultats. En effet, la première partie de cette étude répond à la question des effets des ligands de PPAR γ ainsi que de l'IL-13 dans la résolution d'une candidose gastro-intestinale chez la souris. Pour cela, nous avons développé deux modèles infectieux de candidose digestive murine, un chez des animaux immunocompétents, et un autre chez des animaux immunodéprimés. Ces derniers, chez lesquels nous reproduisons les candidoses gravissimes rencontrés chez les patients immunodéprimés, nous permettent d'envisager la possibilité d'utiliser les ligands de PPAR γ ou les cytokines Th2 en thérapie complémentaire avec les antifongiques déjà présents sur le marché.

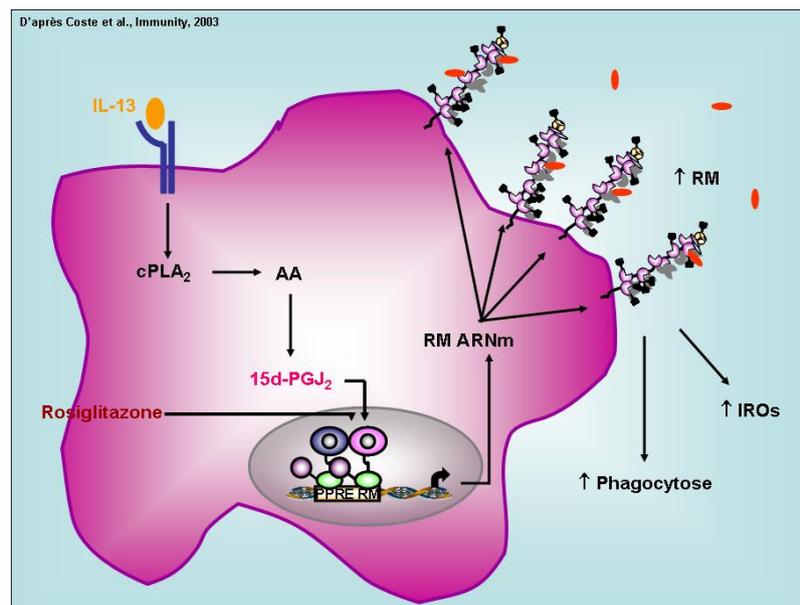


Figure 21 : L'activation de PPAR γ induit l'expression du récepteur mannose des macrophages et permet l'élimination de *Candida albicans in vitro* (d'après Coste, Immunity, 2003 [115])

L'implication des cytokines Th2 dans la réponse anti-infectieuse avait déjà été suggérée par des travaux montrant la capacité de l'IL-4 à induire l'expression de PPAR γ dans les cellules T et à générer dans les monocytes la production de ligands naturels de PPAR γ via les 12- et 15-lipoxygénases (12-15-LOX) [382]. Ces LOX sont responsables de la production de 12-HETE (acides

hydroxyeicosatétraénoïques) et de 13-HODE (acides hydroxyoctadécadiénoïques) qui sont des ligands de PPAR γ et qui inhiberaient la production d'IL-12 par les monocytes et augmenteraient l'expression du CD36 *via* l'activation de PPAR γ . D'autres travaux plus récents menés dans notre laboratoire montrent que l'IL-13 est aussi capable d'activer *in vitro* PPAR γ via la production de 15d-PGJ₂ dans le monocyte humain, et d'induire l'expression du CD36 conduisant à l'augmentation de la phagocytose des érythrocytes parasités par *Plasmodium falciparum* [116]. Ceci renforce notre hypothèse de l'implication du facteur de transcription PPAR γ dans la défense immunitaire.

D'autres travaux montrent l'implication de PPAR γ dans ces mécanismes, et notamment dans l'atténuation du choc septique entraîné par une infection [383]. De plus, hormis ses effets sur l'activation de gène dépendante de la liaison à l'ADN, PPAR γ pourrait aussi jouer un rôle anti-infectieux en bloquant, de façon indépendante de l'ADN, l'activité d'autres facteurs de transcription tels que NF- κ B qui permettraient la transcription de gènes qui auraient un effet pro-inflammatoire.

II.3. Rôles thérapeutiques des ligands de PPAR γ

Les ligands de PPAR γ tels que les thiazolidinediones sont utilisés maintenant dans le traitement de nombreux désordres métaboliques. Ainsi, la rosiglitazone ou encore la pioglitazone sont prescrites en cas de diabète de type 2 et dans le traitement de la résistance à l'insuline. La troglitazone, jusqu'alors utilisée dans les mêmes cas a récemment été retirée du marché en raison de l'induction de rares mais graves hépatotoxicités. Cependant, des études sur des cohortes de patients diabétiques ou en insuffisance cardiaque ont récemment montré que les autres TZDs n'étaient associées avec aucun risque cardiovasculaire [384].

La rosiglitazone est aussi utilisée dans le traitement des désordres du contrôle de la glycémie, dans les maladies inflammatoires, dans le remodelage vasculaire et c...

La seconde partie de nos travaux de recherche étudie la capacité des ligands de PPAR γ et des cytokines Th2 à amplifier la réponse anti-infectieuse des monocytes humains. Cette augmentation des propriétés anti-infectieuses des macrophages grâce à l'activation de PPAR γ pourrait ainsi pour la première fois faire envisager l'utilisation des TZDs dans le traitement des maladies infectieuses opportunistes, en combinaison ou non avec un traitement antifongique, notamment chez les patients immunodéprimés qui ne disposent plus que de ces cellules pour se défendre.

Deuxième partie :
travaux de
recherche

1- L'IL-13 atténue une candidose gastro-intestinale chez des souris immunocompétentes ou immunodéprimées RAG-2^{-/-} *via* l'activation de PPAR γ

1.1. Introduction

Au laboratoire il a été montré précédemment *in vitro* sur des macrophages murins que l'IL-13 et les ligands de PPAR- γ induisent l'expression du récepteur mannose et potentialisent les fonctions anti-infectieuses des macrophages, telles que la phagocytose et la sécrétions d'agents oxydants. Ces mécanismes dépendent de l'activation du facteur de transcription PPAR- γ et conduisent à l'élimination de *Candida albicans in vitro*.

Suite à ces résultats obtenus *in vitro*, notre objectif a été de valider la pertinence de ce modèle *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé des souris immunocompétentes, mais aussi des immunodéficientes qui nous ont permis de mimer les candidoses gastro-intestinales rencontrées chez des patients immunodéprimés. Ainsi, nous avons induit une candidose gastro-intestinale chez ces deux modèles avant de les traiter avec de l'IL-13 et des ligands de PPAR- γ . Notre objectif était de mettre en évidence une corrélation entre ces traitements, l'induction de l'expression du récepteur mannose, la potentialisation des fonctions effectrices des macrophages et une diminution de la colonisation du tractus gastro-intestinal par la levure. Non seulement nous avons montré l'efficacité de ces traitements, mais plus encore nous avons montré qu'ils permettaient un recrutement plus intense des macrophages activés à la muqueuse digestive, favorisant ainsi l'élimination du pathogène. Ces travaux s'inscrivent dans la stratégie d'utilisation de certaines cytokines Th2 telles que l'IL-13, ou préférentiellement de certains agonistes de PPAR- γ telle que la rosiglitazone, déjà utilisée en thérapeutique humaine, dans le traitement des infections fongiques chez les patients sévèrement immunodéprimés.

Dans la seconde partie de l'article, nous nous sommes attachés à définir les mécanismes par lesquels l'IL-13 et les ligands de PPAR- γ agissaient. Précédemment, le rôle du facteur de transcription PPAR- γ a été démontré *in vitro*. Afin de confirmer cela *in vivo*, nous avons utilisé deux stratégies différentes : un antagoniste spécifique et irréversible de PPAR- γ ainsi que des souris hétérozygotes PPAR- $\gamma^{+/-}$. Grâce à ces deux méthodes, nous avons pu mettre en évidence non seulement le rôle de PPAR- γ dans l'induction du récepteur mannose et des fonctions anti-infectieuses par les ligands de PPAR- γ , mais aussi par l'IL-13.

Ce travail est présenté dans l'article suivant, soumis à « Journal of Immunology » et actuellement en cours de révision.

1.2. Travaux de recherche 1

IL-13 attenuates gastrointestinal candidiasis in normal and immunodeficient RAG-2^{-/-} mice via PPAR-gamma activation

Céline Lagane^{*(1)}, Agnès Coste^{†(1)}, Cédric Filipe[‡], Hélène Authier^{*}, Amandine Galès^{*}, José Bernad^{*}, Victorine Douin-Echinard[‡], Jean-Claude Lepert^{*}, Patricia Balard^{*}, Marie-Denise Linas^{*§}, Jean-François Arnal[‡], Johan Auwerx[†] and Bernard Pipy^{*}

⁽¹⁾ Céline Lagane and Agnès Coste contributed equally to this work.

* Laboratoire des Macrophages, Médiateurs de l'Inflammation et Interactions cellulaires, Université Paul Sabatier Toulouse III, INSERM IFR31, Institut Louis Bugnard, BP 84225 - 31432 Toulouse Cedex 4, France.

† Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/ INSERM/Université Louis Pasteur, 1 rue Laurent Fries, BP 10142 – 67404 Illkirch Cedex, France.

§ Département de Parasitologie et Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Hôpital Rangueil, TSA 50032 - 31059 Toulouse Cedex 9, France.

‡ INSERM U858, I2MR, IFR31, Institut Louis Bugnard, BP 84225 - 31432 Toulouse Cedex 4, France.

Keywords: monocytes/macrophages; fungal; cell activation;transcription factors; mucosa

Running title: IL-13 attenuates gastrointestinal candidiasis via PPAR γ

ABSTRACT

We have recently demonstrated that activation of peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ), *in vitro*, in mouse resident peritoneal macrophages by IL-13 or PPAR γ ligands promotes uptake and killing of *Candida albicans* through mannose receptor (MR) overexpression. In this study, we demonstrate that treatments of immunocompetent and immunodeficient RAG-2^{-/-} mice by PPAR γ ligands (rosiglitazone or 15d-PGJ₂) or by IL-13 using peritoneal route, decrease *Candida albicans* colonization and invasion of the gastrointestinal tract 8 days following oral infection with the yeast. We also demonstrate that *Candida* infection of the gastrointestinal tract triggers macrophage recruitment in caecum mucosa as shown by confocal microscopy. These mucosal macrophages, as well as peritoneal macrophages, overexpress the MR after treatment of mice with IL-13 or rosiglitazone. These treatments promote macrophage activation against *Candida albicans* as suggested by the increase of the capacity of peritoneal macrophages to phagocyte *Candida albicans* and to produce reactive oxygen intermediates after yeast challenge *ex vivo*. These effects on *Candida albicans* colonization and invasion of the gastrointestinal tract and on macrophage activation are suppressed by treatment of mice with GW9662, a selective PPAR γ antagonist, and reduced in PPAR γ ^{+/-} mice. In combination, these data show that IL-13 or PPAR γ ligands attenuate *Candida albicans* infection in gastrointestinal tract via PPAR γ activation and suggest that PPAR γ ligands, such as thiazolidinediones, may be useful therapeutic agents for the treatment of gastrointestinal diseases caused by *Candida albicans*.

INTRODUCTION

Candida albicans is part of the microbial flora that colonizes the mucocutaneous surfaces of the oral cavity and gastrointestinal tract of many mammals as well as other organisms (1). This yeast represents a serious issue in the immunocompromised patients and those undergoing immunosuppressive therapies, particularly with impaired phagocytic cell function (mainly neutrophils, monocytes and macrophages). The innate immune system initiated by macrophages is therefore essential for orchestrating events associated with prevention of fungal colonization. Macrophages play a direct role in microbial killing through their capacities to phagocytize yeasts and to exert their fungicidal activity by releasing large amounts of highly toxic molecules such as reactive oxygen and nitrogen intermediates (ROIs and RNIs). These two mechanisms involve macrophage mannose receptor (MR), a key pattern-recognition receptor (PRR) of innate immunity (2). Indeed, this receptor is both a major phagocytic and an endocytic receptor sufficient to mediate binding and phagocytosis of a range of unopsonized microorganisms bearing terminal mannose, fucose, or N-acetylglucosamine residues on cell surface such as *Candida albicans* (3), *Pneumocystis carinii* (4), *Klebsiella pneumoniae* (5). Binding or internalization of natural or synthetic ligands of MR may modulate macrophage functions, including respiratory burst (6) and synthesis of proinflammatory cytokines (such as IL-1 β , IL-6 and GM-CSF) (7) to increase microbicidal capacity. Previous studies have shown that MR expression can be positively modulated *in vitro* by many agents, in particular by 1.25-dihydroxyvitamin D3 (8), prostaglandin E2 (9), interleukin (IL)-4 and (IL)-13 (10, 11). Further support for a role of IL-13 in the control of innate immune response came from characterization of susceptibility to infection of animals that were deficient in IL-13. IL-13^{-/-} mice failed to clear gastrointestinal nematodes infections efficiently (12), suggesting that IL-13 is an important endogenous mediator of microbial resistance. The classical IL-13 signalling pathway involves the transcription factor STAT-6. This has firstly been shown for 12/15-lipoxygenase, CD23, CD13, CD11b and class II CMH up-regulation for example (13, 14). But other transcription factors can be involved in IL-13 signalling. We showed previously that the increase of macrophage MR expression by IL-13 involved peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) activation via a PLA2 signalling pathway (6). In the same study, an unanticipated antimicrobial action of PPAR γ resulted from of a cross-talk between PPAR γ and the *in vitro* regulation of MR expression through which PPAR γ contributes to increased recognition and phagocytosis of unopsonized *Candida albicans*. While the role of PPAR γ in the regulation of adipogenesis (15), lipid homeostasis and monocyte gene expression and differentiation (16) is relatively well established, its involvement in antimicrobial defence has not been explored.

In this study, we validate the potent *in vivo* immunostimulatory role of natural and synthetic PPAR γ specific ligands and IL-13 to fight *C. albicans* colonization in experimental gastrointestinal candidiasis. We demonstrate that *in vivo* treatments with PPAR γ ligands and IL-13 decrease significantly *Candida* infection in gastrointestinal tract both in immunocompetent and immunodeficient RAG-2^{-/-} mice. The use of RAG-2^{-/-} mice, lacking T and B cells, demonstrates the predominant role of macrophages in these mechanisms. Moreover, the reduction of *C. albicans* colonization in digestive tract by PPAR γ ligands and IL-13 is correlated with an increase of MR expression on recruited mucosal macrophages.

The study of peritoneal macrophages properties shows that PPAR γ ligands and IL-13 increase their capacities to phagocytize *Candida* and to produce ROIs, leading to decrease of *Candida* proliferation.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

The strain of *C. albicans* used throughout these experiments was isolated from a blood culture of a Toulouse-Rangueil Hospital patient. The isolate was identified as *Candida albicans* based on common laboratory criteria and cultured on Sabouraud dextrose agar (SDA) plates containing gentamicin and chloramphenicol. *Candida albicans* was maintained by transfers on SDA plates. Growth from an 18- to 24-h SDA culture of *Candida albicans* was suspended in sterile saline to a concentration of 1.10^8 cells per ml, as determined by hemacytometer counts and verified by plate counts.

Mice and infection procedures

All animal experimentation was conducted in accordance with accepted standards of humane animal care. Mouse experiments were approved and performed according to the guidelines of the Toulouse University Animal Safety Committee and of the Safety Regional Committee (Procedure N°1992). The model of gastrointestinal candidiasis was established on six week-old female C57BL/6 mice (wild-type) (Janvier, France) and immunodeficient *RAG-2*^{-/-} C57BL/6 mice (CNRS, Orléans, France) or SV129 mice (wild-type) and PPAR γ ^{+/-} SV129 mice (ICS, Illkirch, France). Because the *RAG-2*^{-/-} animals have no B- or T-cell-mediated immunity (17), they were housed in sterile microisolator cages, with autoclaved food, sterile water *ad libitum*, bedding and under defined flora that is nonpathogenic. All cages were changed twice weekly, and all manipulations of the animals were done in a laminar flow hood under aseptic conditions. The photoperiods were adjusted to 12 hr of light and 12 hr darkness daily. The experimental procedure to establish esophageal and gastrointestinal candidiasis in mice was as follows. Mice awake were intra-esophageally infected with 5.10^7 viable cells of *C. albicans* in sterile saline solution (500 μ L) per mouse. Any antibiotic or immunosuppressive treatment was used to facilitate the mucosal infection by *C. albicans* of oral cavity and gastrointestinal tract.

Treatment groups

Therapeutic studies were performed on separate groups of 6 mice each infected or not by *C. albicans*. Wild-type, *RAG-2*^{-/-} and PPAR γ ^{+/-} mice had received the following products in 500 μ l of NaCl 0.9 % by intraperitoneal route. Final DMSO concentration was lower than 0.1% (v/v). Mice were treated with IL-13 (Sanofi, Labège, France) one day before infection with *C. albicans* at final concentration of 5 μ g per mouse. For treatment with PPAR γ ligands, 15d-PGJ₂ (Cayman) and rosiglitazone (Cayman), mice were injected one day before infection, the day of infection and then every two days at a final concentration of 0.1 μ M per mouse. GW9662 (Cayman), a PPAR γ antagonist was administered 30 min before IL-13 or rosiglitazone injections at final concentration of 220 μ M per mouse. Control groups received saline solution with DMSO without rosiglitazone, 15d-PGJ₂ or IL-13. GW9662 control group received GW9662 without rosiglitazone or IL-13. The body weight of each mouse was recorded daily, and the condition of each mouse was assessed twice daily. On day 8 after treatments (7 days after

infection), all mice were euthanized using CO₂ asphyxia. At this time point esophagus, stomach, cecum, liver and kidneys were aseptically removed to evaluate *Candida albicans* colonization.

Quantification of the number of viable Candida albicans in the esophagus, gastro-intestinal tract and visceral organs

Each tissue sample removed was mechanically homogenized in 1 ml of saline with 100 U of penicillin and 100 µg of streptomycin per ml. Serial dilutions of homogenate were plated onto SDA for quantitative determination of the number of *C. albicans* in the tissue samples. Plates were incubated at 37°C for 1-2 days and the number of colonies counted. The number of CFU in each organ was determined.

Quantification of the number of viable Candida albicans in the esophagus, gastro-intestinal tract and visceral organs using a Quantitative Real-Time PCR

Cell lysis and DNA extraction. 100 µL of each tissue sample homogenate was resuspended in 800 µL of lysis buffer (0.05 M EDTA, 0.1 M SDS, 0.05 M Tris-HCl, 1 % 2mercapto-éthanol) for 3 hours at 65°C (18). DNA was extracted with phenol-chloroform isoamyl alcohol, and then 4.5 ml of 5 M ammonium acetate followed by 2 volumes of 100% ethanol was added. DNA was precipitated for 1 h at -80°C and recovered by centrifugation for 20 min at 12,000 x *g*. A gentle 70% ethanol wash was performed, and the pellets were then dried under a vacuum for 10 min. These DNA pellets were resuspended in 100 µL of sterile deionized water and allowed to resuspend overnight. After DNA extraction, 3 µl of samples of the same mice groups were pooled to perform the quantification by PCR.

Light-Cycler-based PCR assays. Light Cycler PCR and detection system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) has been used for amplification and online quantification. PCR was performed in glass capillaries, which ensures rapid equilibration between the air and the reaction components because of the high surface-to-volume ratio of the capillaries. Primers (5'-ATT GGA GGG CAA GTC TGG TG and 5'-CCG ATC CCT AGT CGG CAT AG, Eurogentec, France) bind to conserved regions of the fungal 18S rRNA gene as described before (19). For amplicon detection, Light Cycler DNA Master Hybridization Probes Kit was used as described by the manufacturer. Briefly, two different oligonucleotides hybridize to an internal species-specific sequence of the 18S rRNA gene of *C. albicans*. One probe has been labeled at the 5' end with the Light Cycler Red 640 fluorophore (5'-TGG CGA ACC AGG ACT TTT ACT TTG A) (Tibmolbiol, Berlin, Germany), and the other has been labeled at the 3' end with fluorescein (5'-AGC CTT TCC TTC TGG GTA GCC ATT, Tibmolbiol, Berlin, Germany) (20). During FRET, fluorescein is excited by the light source of the Light Cycler instrument. The excitation energy is transferred to the acceptor fluorophore, Light Cycler Red 640, and the emitted fluorescence is measured after annealing by the photohybrids of the instrument. The PCR mixture contained Taq polymerase, 1X Light Cycler hybridization reaction buffer, a deoxynucleoside triphosphate mixture (with dUTP instead of dTTP), 3 mM magnesium chloride, and 12.5 pmol of primers. Amplification were performed for 45 cycles of repeated denaturation (1 s at 95°C), annealing (15 s at 62°C), and enzymatic chain extension (25 s at 72°C).

Light-Cycler-based quantification of target DNA. Quantification was performed by online monitoring for identification of the exact time point at which the logarithmic linear phase could be distinguished from the background (crossing point). Serially diluted samples of genomic fungal DNA obtained from *C. albicans* cultures (10^6 to 10^0 CFU) were used as external standards in each run. Cycle numbers of the logarithmic linear phase were plotted against the logarithm of the concentration of template DNA to evaluate the yeast number of each tissue sample homogenate.

Preparation of mouse resident peritoneal macrophages

After euthanasia of infected or uninfected mice 8 days after *in vivo* treatment or not with IL-13, 15d-PGJ₂, rosiglitazone and/or GW9662, resident peritoneal cells were harvested by washing the peritoneal cavity with 5 ml of sterile 199 medium with Hanks' salts as previously described (6). Collected cells were centrifuged at 400g for 8 min and cell pellet was suspended in serum-free medium (SFM) optimized for macrophage culture (Gibco Invitrogen Corporation, France) and was counted in hemocytometer. The number of cells harvested by peritoneal lavage from each treatment group was similar (3.10^6 cells/mouse) and the percentage of macrophages was not significantly different between the different groups of mice. Cells were allowed to adhere onto 24- or 96-well culture plates for 1 h at 37°C and 5% CO₂. Non-adherent cells were removed by washing with phosphate buffered saline (PBS) (Gibco Invitrogen Corporation, France). After 2 h of culture, more than 98% of the adherent cells thus obtained had the morphological appearance of macrophages after May–Grunwald Giemsa staining and were detected as positive for nonspecific esterase. Macrophage monolayers were used to investigate phagocytosis capacity and ROIs production of these cells after *Candida albicans* challenge *in vitro* and to evaluate Mannose Receptor (MR) surface expression.

Phagocytosis assay

To investigate the mechanism of *C. albicans* ingestion by murine peritoneal macrophages, we used [³H]uracil-prelabeled yeasts. Three *C. albicans* colonies were dispersed in 1 ml of Sabouraud broth containing 150 µCi [³H]uracil. After 24 h of growth at 37°C, the pellet was resuspended in SFM supplemented with glucose 1.8 %. 5×10^5 macrophages collected on mice untreated or treated *in vivo* by IL-13, 15d-PGJ₂, rosiglitazone and/or GW9662 were plated in 24-well Falcon plates. Then macrophages were infected with viable labeled *C. albicans* for 1 and 2 h (ratio of macrophage: yeast, 1:1) at 37°C and at 5°C respectively to study *Candida* internalization by macrophages and *Candida*-cell adhesion. After each incubation period (1 h or 2 h), culture medium was collected, monolayers washed twice with PBS and washings kept. Monolayers were disrupted as described previously. Radioactivity of the supernatant and washings, and radioactivity contained in cellular lysate were counted independently. Index of phagocytosis is calculated with the following equation:

$$\% \text{ Phagocytosis} = \Delta_{(37^{\circ}\text{C}-5^{\circ}\text{C})} \text{ dpm monolayers} / (\Delta_{(37^{\circ}\text{C}-5^{\circ}\text{C})} \text{ dpm monolayers} + \text{dpm supernatant})$$

Assay for oxidising agents production

Oxygen-dependent respiratory burst of macrophages collected on mice untreated or treated *in vivo* by IL-13, 15d-PGJ₂, rosiglitazone and/or GW9662 was measured by chemiluminescence (CL) in presence of 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (luminol) using a thermostatically (37°C) controlled luminometer (Wallac 1420 Victor², Finland). Generation of CL was monitored continuously for 1 h after incubation of 1.5×10^5 macrophages with luminol (66 µM) and after *C. albicans* challenge (1:1). Statistical analysis was performed using the area under the curve expressed in counts × second.

Mannose receptor surface expression

To evaluate MR surface expression on mouse peritoneal macrophages harvested from mice untreated or treated *in vivo* by IL-13, 15d-PGJ₂, rosiglitazone and/or GW9662, 10^6 peritoneal cells were directly incubated with a mannosylated bovine serum albumin (mBSA) an MR specific ligand, conjugated with FITC (840 nM) (7, 10). Labelling of MR was done during 1 hour on ice. In our study we checked that binding of the FITC-Mannose-BSA could be fully reversed by mannose-BSA without FITC or yeast mannan addition but not by BSA. In order to facilitate the selection of viable cell population a staining with propidium iodide was done. All analyzes were done on a Becton-Dickinson FACScan using CellQuest software. A population of 20,000 viable cells was analyzed for each data point.

Immunohistochemical analysis of cecum macrophages

Cecum tissues of wild type mice infected or not and / or treated or not by rosiglitazone or IL-13 were removed, and carefully longitudinally opened. After washing in PBS, tissues were fixed for 20 min in PBS containing 4% paraformaldehyde. Then, fixation was quenched with 100 mmol/L of glycine (pH 7.4), and samples were permeabilized for 10 min in Triton X-100 and washed in PBS. Fixed tissues were blocked with solution I (75 mM NaCl, 18 mM Na₃ citrate, 2% goat serum, 1% BSA, 0.05% Triton X-100 and 0.02% NaN₃) for 2 h at room temperature. Tissues were first stained with CD68 by incubating cecum samples with CD68 antibody (Serotec, rat anti mouse) was diluted in solution I (1:100) for 48 hours at 4°C. Then, tissues were washed with solution II (75 mM NaCl, 18 mM sodium citrate, and 0.05% Triton X-100) for 2 hours and rinsed in phosphate-buffered saline. Tissues were then incubated for 1 hour at room temperature with Alexa 633-conjugated goat anti rat antibody (5 µg/ml; Molecular Probes, Eugene, OR) diluted in solution I. Finally, tissues were washed in solution I for 1 hour at room temperature. Same protocol was repeat for anti CD206 labelling (Santa Cruz biotech, rabbit anti mouse, 1:250), and the second antibody (Goat anti rabbit, Sigma). To label the nuclei, propidium iodide was used (2 µg/ml, Sigma). All preparations were mounted with Kaiser's glycerol gelatin (Merck, Darmstadt, Germany). All microscopy imagery was performed with ZEISS LM 510 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany).

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SE of six different animals. For each experiment, data were subjected to one-way analysis of variance followed by the means multiple comparison method of Tukey. $P < 0.05$ was considered as the level of statistical significance.

RESULTS

In vivo treatments of normal and immunodeficient *RAG-2*^{-/-} mice with PPAR γ ligands and IL-13 decrease *C. albicans* colonization in the gastrointestinal tract

Mice were infected by esophageal route with *Candida albicans*. In this study, to modelize infections which closely mimic diseases found in human HIV⁺ patients, we used a mouse strain with recombination-activating gene 2 knockout (*RAG-2*^{-/-}). As in AIDS patients, B- and T-cell-mediated immune mechanisms are absent, and only the cells of innate immunity (such as macrophages) remain effective. In this model of oropharyngeal and gastrointestinal colonization by *Candida albicans* in wild type and *RAG-2*^{-/-} mice, yeasts extensively colonized the esophagus and the gastrointestinal (GI) tract. None yeasts were recovered in homogenates of other internal organs (kidney and liver), demonstrating the absence of disseminated disease. The number of yeasts recovered in esophagus and cecum was significantly increased in immunodeficient *RAG-2*^{-/-} mice when compared to immunocompetent mice (Fig.1A, 1B, 1C), demonstrating that B and T-cell-mediated immune mechanisms are important in limiting proliferation of *C. albicans* in these organs.

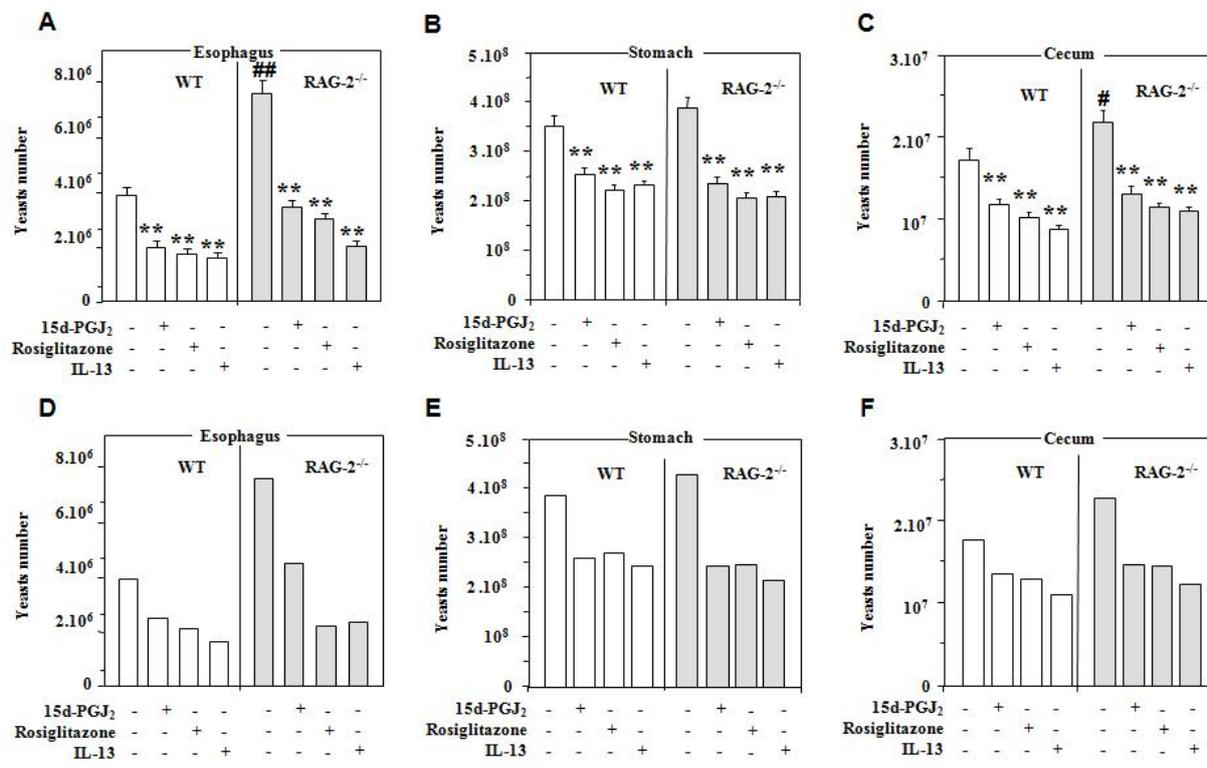


Figure 1: Intraperitoneal treatment of immunocompetent or immunocompromised mice with PPAR γ ligands or IL-13 decrease the gastrointestinal tract colonization by *C. albicans*. Stomach and cecum of immunocompetent (WT) or immunocompromised (*RAG-2*^{-/-}) mice infected with *C. albicans* and treated intraperitoneally or not with rosiglitazone, or 15d-PGJ₂ or IL-13 as indicated in Materials and methods, were removed and mechanical homogenized. The number of CFUs in these organs was determined on chromogen medium specific of *C. albicans*. Values represent the mean \pm SE of six different mice on the same group. ** (p<0.01) represents a significative difference with the control groups (A and B) without treatment with PPAR α ligands or IL-13. After cell lysis and DNA extraction performed on stomachs (C) and cecums (D) removed on mice treated intraperitoneally by 15d-PGJ₂, rosiglitazone or IL-13, 3 μ l of each DNA sample in the same group were pooled. The quantity of yeasts' DNA was determined by quantitative PCR using Light-Cycler technology. The yeast number of each tissue sample homogenate were calculated with a standard curve using various concentrations of yeasts analyzed in parallel in the same run as indicated in materials and methods.

Interestingly, after treatment with 15d-PGJ₂, rosiglitazone or IL-13, the number of yeasts present in esophagus, stomach and cecum was significantly decreased both in immunocompetent and immunodeficient RAG-2^{-/-} mice (Fig.1A, 1B, 1C). Similar conclusions were obtained from *C. albicans* DNA quantification by quantitative RT-PCR, which demonstrated that the various treatments decreased *C. albicans* colonization of esophagus and gastrointestinal tract from immunocompetent and immunodeficient RAG-2^{-/-} mice (Fig.1D, 1E, 1F). This clearly demonstrates the protective effect of 15d-PGJ₂, rosiglitazone and IL-13 treatments against *C. albicans* mucosal colonization.

IL-13 and rosiglitazone treatments trigger recruitment to caecum mucosa of macrophages that overexpress MR

Since MR is the main PRR involved in mannanes recognition and its overexpression by IL-13 or rosiglitazone leads *in vitro* to elimination of *Candida albicans* (6), we evaluated the recruitment of macrophages expressing this receptor to the digestive mucosa of mice infected with *C. albicans* and treated with IL-13 or rosiglitazone.

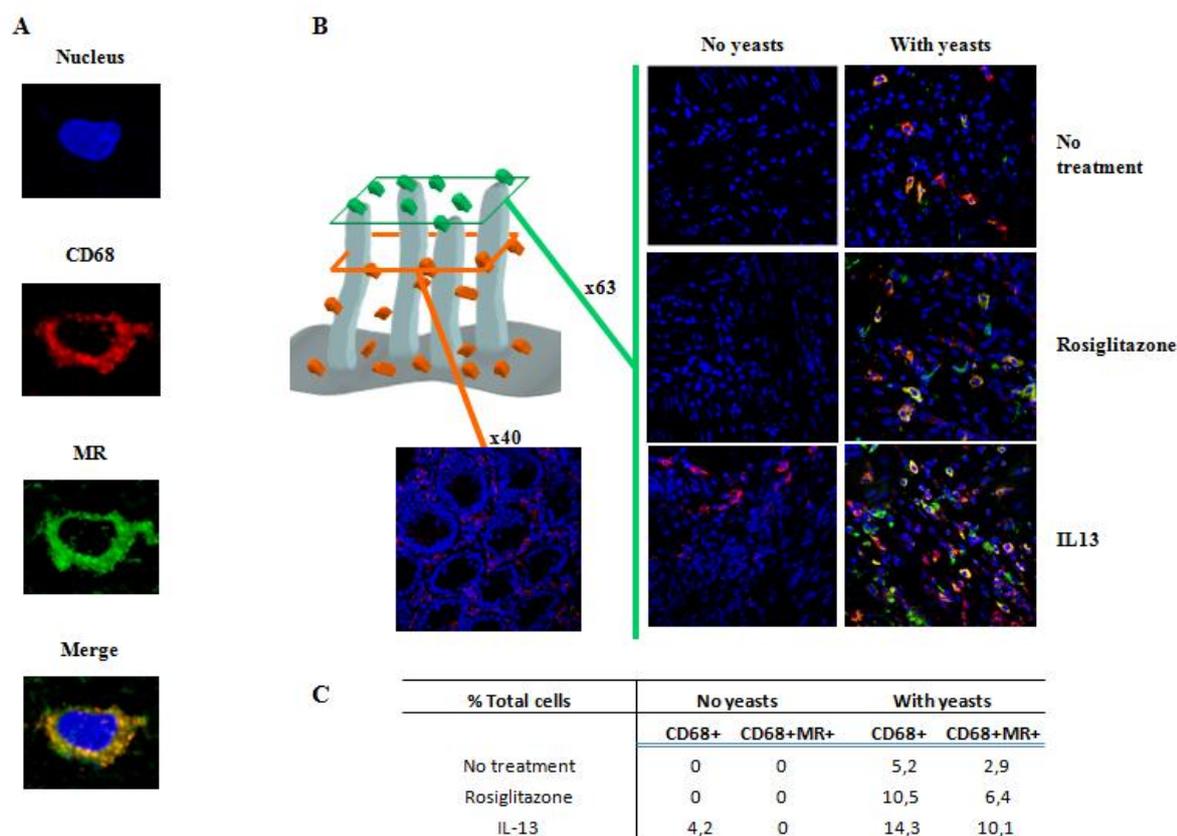


Figure 2: Intraperitoneal treatments of mice with PPAR γ ligands or IL-13 provoke the recruitment of macrophages expressing mannose receptor to the cecal mucosa. Cecum tissues of mice infected or not and / or treated or not with rosiglitazone or IL-13 were removed and carefully longitudinally opened. Tissues were fixed and stained with anti-CD68 antibody (Serotec, rat anti mouse, 1:100), anti-CD206 antibody (Santa cruz biotech, rabbit anti mouse, 1:250), and the second antibody (Goat anti rabbit, Sigma). Then, tissues were washed and stained with fluorophore-conjugated antibodies (goat anti rat Alexa 633, 5 μ g/ml; Molecular Probes, Eugene, OR). To label the nuclei, propidium iodide was used (2 μ g/ml; Sigma). All preparations were mounted with Kaiser's glycerol gelatin (Merck, Darmstadt, Germany) (A and B). All microscopy imagery was performed with ZEISS LM 510 (Carl Zeiss GmbH, Jena, Germany).

Figures 2B and 2C show that in absence of yeasts and treatment (upper left panel), CD68⁺ cells are not present in the cecal mucosa. However, with IL-13 treatment (lower left panel), but not with rosiglitazone (medium left panel), the number of CD68⁺ cells increased (4.2 % of total cells), indicating that the treatment with IL-13 is able to recruit CD68⁺ cells. After *Candida albicans* inoculation, the presence of CD68⁺ increased (right panels) attesting the capacity of the yeasts to recruit CD68⁺ cells in the cecal mucosa. Moreover, in absence of treatment (upper right panel), these cells expressed slightly the MR (2.9 % of total cells). Treatments with both rosiglitazone and IL-13 increased the number of CD68⁺MR⁺ cells respectively of 6.4 % (medium right panel) and 10.1 % (lower right panel). These results demonstrate that IL-13 and rosiglitazone treatments favour the infiltration of macrophages in the cecal mucosa with a strong proportion of macrophages type 2 MR⁺ (M2). We also demonstrate that only macrophages on the top of the villus, and not macrophages deep in crypts, are able to express MR (Fig. 2A).

In vivo treatments of normal and immunodeficient RAG-2^{-/-} mice with PPAR γ ligands and IL-13 induce over-expression of MR and effector functions of murine peritoneal macrophages

To precisely assess to which extents PPAR γ ligands (rosiglitazone and 15d-PGJ₂) and IL-13 promote *in vivo* the expression of MR (current study, Fig. 2), we analyzed by flow cytometry, using labeled mBSA-FITC, the induction of MR expression by murine peritoneal macrophages harvested from WT or RAG-2^{-/-} mice treated with IL-13, 15d-PGJ₂ or rosiglitazone. As shown in Figure 3A, the amount of labeled mBSA-FITC on peritoneal macrophages collected from *in vivo* 15d-PGJ₂- or rosiglitazone-treated normal or immunodeficient RAG-2^{-/-} mice was significantly increased as compared to macrophages of untreated mice. Similarly, labeling was significantly higher following treatment with IL-13. The specificity of mBSA for MR suggests that *in vivo* treatments with PPAR γ ligands or IL-13 increase protein level of MR on the surface of peritoneal macrophages of both immunocompetent and immunodeficient mice.

Since the mechanisms of defense against *Candida* are mainly dependent on the capacity of macrophages to phagocytize yeasts and to exert their fungicidal activity by releasing large amounts of highly toxic molecules such as reactive oxygen intermediates (ROIs), we studied the modulation of *Candida* phagocytosis and oxidant agents production of macrophages from untreated, 15d-PGJ₂, rosiglitazone or IL-13-treated mice. Figure 3B showed that when macrophages were harvested on 15d-PGJ₂- or rosiglitazone-treated immunocompetent or immunodeficient RAG-2^{-/-} mice, the number of [³H]uracil-prelabeled *C. albicans* ingested increased significantly compared to macrophages from untreated mice. Similar results were obtained from macrophages of IL-13-treated immunocompetent or immunodeficient RAG-2^{-/-} mice. Hence, these studies suggested that *in vivo* treatments of mice with PPAR γ ligands and IL-13 significantly stimulate the capacity of macrophages to take up *C. albicans*. Regression analysis of the data described in Fig. 3A and Fig. 3B shows significant linear regressions ($r^2=0.987$ for normal mice and $r^2=0.972$ for immunodeficient RAG-2^{-/-} mice) between MR fluorescence and phagocytosis by macrophages, demonstrating a true correlation between MR expression as influenced by different treatments and the capacity of these cells to take up *C. albicans*.

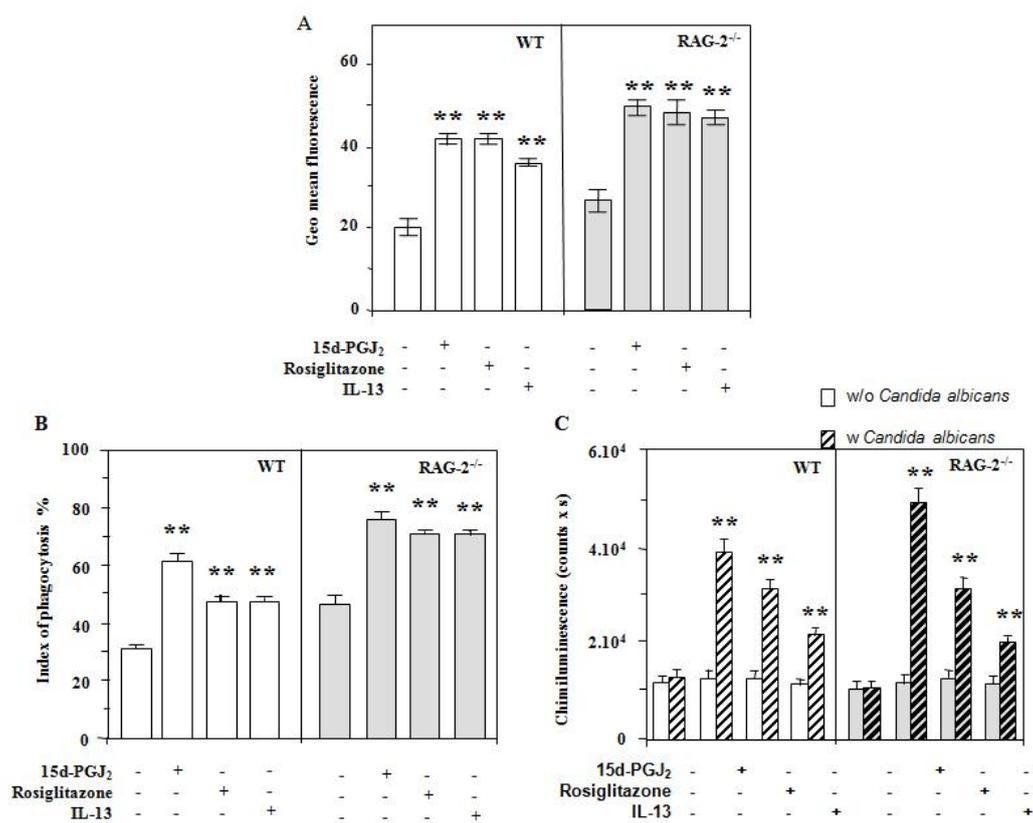


Figure 3: Rise of mannose receptors and fungicidal properties of peritoneal macrophages harvested from the peritoneal cavity of immunocompetent or immunocompromised mice treated intraperitoneally by PPAR γ ligands or IL-13. Peritoneal macrophages of immunocompetent (WT) or immunocompromised ($RAG-2^{-/-}$) mice treated or not with 15d-PGJ₂, rosiglitazone or IL-13 by intraperitoneal route, were harvested from peritoneal cavity, and stained with mBSA-FITC. The Geo Mean is representative of one test performed on six different mice in the same group (A). Peritoneal macrophages harvested from the peritoneal cavity of immunocompetent (WT) or immunocompromised ($RAG-2^{-/-}$) mice were tested for their capacities to phagocyte after one hour challenge with yeasts labelled with [³H]-uracile (1:1). The phagocytosis index represents the mean \pm SE of six different mice in the same group (B). Macrophages were tested for their capacities to produce ROIs in response to *C. albicans* (C). ROIs production evaluated by chemiluminescence assay was measured during 60 minutes in absence \square or in presence \square of *C. albicans* (ratio macrophage/ yeast : 1/1) (C). Values represent the mean \pm SE of six different mice in the same group. ** ($p < 0.01$) represents a significative difference with the corresponding control groups with *C. albicans* without treatments.

Using chemiluminescence (CL), we next investigated the effect of 15d-PGJ₂, rosiglitazone and IL-13 *in vivo* treatments on macrophage oxidizing agents' production. Fig. 3C shows that *in vivo* treatments of both immunocompetent and immunodeficient $RAG-2^{-/-}$ mice have no effect on the basal production of oxidizing agents by macrophages compared to macrophages from untreated mice. Addition of yeasts to macrophages from untreated mice did not increase the production of oxidizing agents, but significantly increased the ROIs production by macrophages from 15d-PGJ₂-, rosiglitazone- and IL-13-treated immunocompetent and immunodeficient $RAG-2^{-/-}$ mice. These data therefore suggest that these treatments pre-activate the capacity of macrophages to produce oxidizing agents in response to *Candida albicans* infection.

A PPAR γ antagonist inhibits MR overexpression and candidacidal activity induced *in vivo* by IL-13 and rosiglitazone treatments

To assess the mechanisms involved in the increase of MR expression and microbicidal functions of macrophages from IL-13- or PPAR α ligands-treated mice, we subjected mice to intraperitoneal injections with GW9662, an irreversible antagonist of PPAR α , 30 min before IL-13 or rosiglitazone administrations. As expected, IL-13 and rosiglitazone *in vivo* treatments increase significantly MR expression on peritoneal macrophages (Fig. 4A). Interestingly, the increase of MR surface expression observed in macrophages from rosiglitazone- and IL-13-treated mice is totally abolished by *in vivo* GW9662 pre-treatment. This strongly suggests that *in vivo* PPAR γ activation takes part to the up-regulation of MR expression mediated by IL-13 or rosiglitazone.

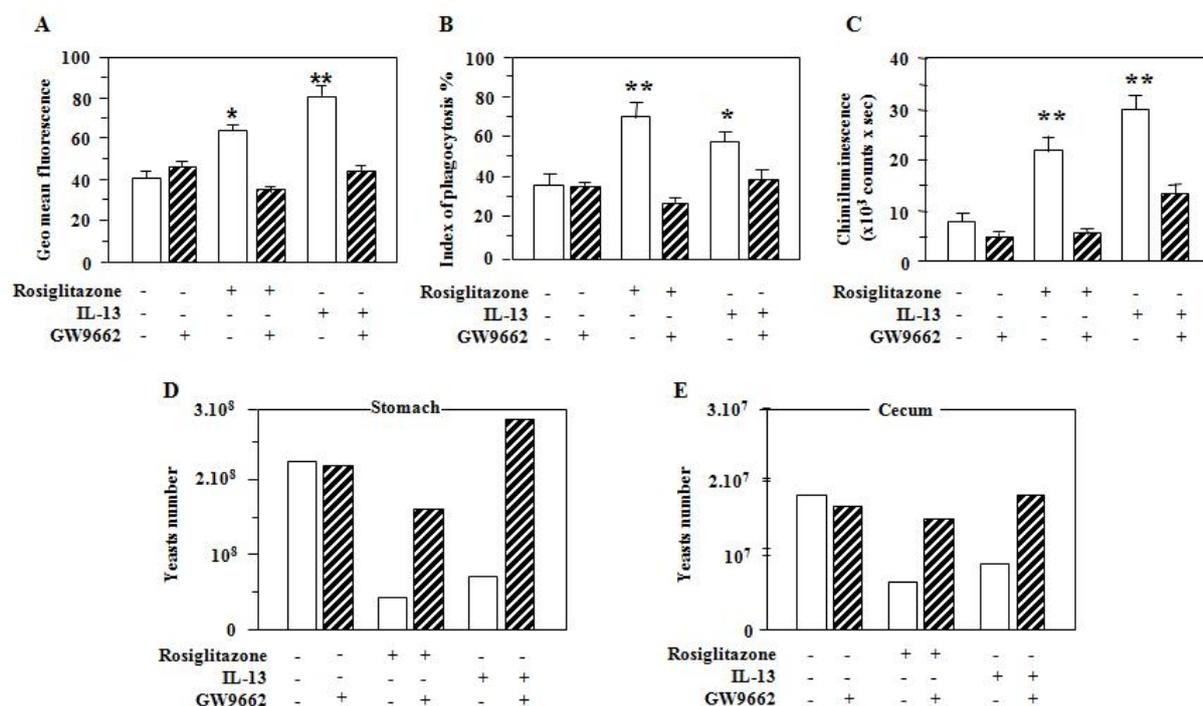


Figure 4: Treatment of mice with GW9662, an antagonist of PPAR γ , suppresses the effects of IL-13 and rosiglitazone on mannose receptor expression and fungicidal activity. Macrophages harvested on mice treated intraperitoneally with rosiglitazone, IL13 or/and GW9662, were stained with mBSA-FITC to determine macrophage Mannose Receptor expression. *(p<0.05), ** (p<0.01) represents a significative difference with the corresponding control groups without treatments (A). Macrophages were tested for their capacities to phagocyte *C. albicans* after a one hour challenge with yeasts labelled with [³H]-uracile (1:1). The phagocytosis index represent the mean \pm SE of six different mice in the same group. * (p<0.05), ** (p<0.01) represents a significative difference with the corresponding control groups without treatments (B). Macrophages were tested for their capacities to secrete ROIs. ROIs production evaluated by chemiluminescence assay was measured during 60 minutes in presence of *C. albicans* (ratio macrophage / yeast : 1/1). Values represent the mean \pm SE of six different mice in the same group. ** (p<0.01) represents a significative difference with the corresponding control groups with *C. albicans* without treatments (C). After cell lysis and DNA extraction performed on stomachs (D) and cecums (E) removed on mice treated intraperitoneally with rosiglitazone, IL13, and/or GW9662, 3 μ l of each DNA sample in the same group were pooled. The quantity of yeasts' DNA was determined by quantitative PCR using Light-Cycler technology. The yeast number of each tissue sample homogenate were calculated with a standard curve using various concentrations of yeasts analyzed in parallel in the same run as indicated in materials and methods.

To further consolidate our hypothesis that PPAR γ promotes the regulation of MR expression and hence activates the effector functions of macrophages, we studied the capacity of phagocytosis and ROIs production of GW9662- and rosiglitazone- or IL-13-treated macrophages in response to *C. albicans* infection. As predicted, the increase of both the phagocytosis index and the production of the

oxidizing agents by macrophages treated by rosiglitazone and IL-13 are inhibited by GW9662 (Fig. 4B, 4C).

Coherent with our previous results, when animals received GW9662, the reduction of *C. albicans* in digestive organs (stomachs and cecums) induced by IL-13 or rosiglitazone treatments is impaired, indicating a major contribution of PPAR γ activation in the induction of fungicidal activity by *in vivo* treatments with IL-13 or rosiglitazone (Fig. 4D, 4E).

These data therefore provide strong arguments for the *in vivo* implication of PPAR γ in the increase of MR expression and hence in the fungicidal activity of macrophages treated by rosiglitazone and IL-13.

MR over-expression and *C. albicans* elimination are impaired in PPAR $\gamma^{+/-}$ mice

These previous data were all consistent with an involvement of PPAR γ in the induction of MR expression and fungicidal activity by IL-13 and rosiglitazone, and incited us to evaluate whether these treatments were effective in a genetic model of mice which presents a very low expression of PPAR γ (PPAR $\gamma^{+/-}$ mice), as determined by Western Blot and quantitative RT-PCR (data not shown).

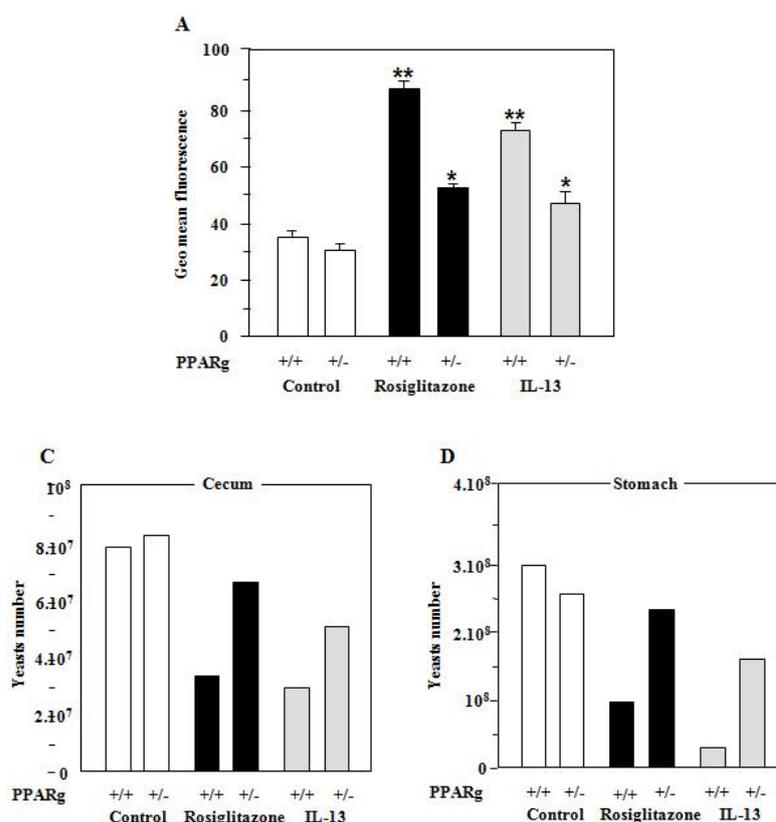


Figure 5: The rise of macrophage Mannose Receptor and the decrease of gastrointestinal colonisation by *C. albicans* are impaired in PPAR $\alpha^{+/-}$ mice. Peritoneal Macrophages of homozygous (PPAR $\alpha^{+/+}$) or hemizygous (PPAR $\alpha^{+/-}$) mice, treated or not with rosiglitazone and IL-13 by intraperitoneal route, were harvested and stained with mBSA-FITC to determine mannose receptor expression. * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) represents a significant difference with the corresponding control groups without treatments (A). After cell lysis and DNA extraction performed on stomachs (B) and cecums (C) removed on these mice, 3 μ l of each DNA sample in the same group were pooled. The quantity of yeasts' DNA was determined by quantitative PCR using Light-Cycler technology. The yeast number of each tissue sample homogenate were calculated with a standard curve using various concentrations of yeasts analyzed in parallel in the same run as indicated in materials and methods.

IL-13 and rosiglitazone *in vivo* treatments increased significantly MR expression on peritoneal macrophages from wild type mice (PPAR $\gamma^{+/+}$ mice) (Fig. 5A). However, this induction of MR expression evident in macrophages collected on rosiglitazone- and IL-13-treated PPAR $\gamma^{+/+}$ mice is not observed on rosiglitazone- and IL-13-treated PPAR $\gamma^{+/-}$ mice (Fig. 5A). In line with this result, the reduction of *C. albicans* colonization in stomachs and cecums after IL-13 or rosiglitazone treatments of PPAR $\gamma^{+/+}$ mice is impaired in PPAR $\gamma^{+/-}$ mice (Fig. 5B and 5C).

DISCUSSION

Candida albicans is a fungus that can exist as a harmless colonizer or as an opportunistic pathogen, depending on the status of its host (20). So, *C. albicans* usually causes disease in immunocompromised hosts such as leukemic, organ-transplanted, diabetic, and human immunodeficiency virus (HIV)-infected patients. In immunocompetent hosts, innate and acquired humoral and cellular immune mechanisms are involved in resistance to candidiasis. Involvement of cell-mediated immunity in the control of infection is considered to be important for resistance to mucocutaneous and systemic candidiasis. In this process, macrophages serve as the effector cells of an immune response orchestrated by T cells (21). Exposure of macrophages to either Th1 or Th2 cytokines induces two distinct pathways of macrophage activation (22, 23).

Classically, protective immunity to *C. albicans* infection results from the development of Th1 responses (24). So, cytokines produced by Th1 cells, such as IFN- γ , activate phagocytic cells to a candidacidal state increasing the secretion of effector molecules and in particular ROIs (11). Th2 cytokines, IL-4 and IL-13, were subsequently found to be more than simple inhibitors of macrophage activation, as they elicit a different activation program, termed macrophage alternative activation (23). Macrophages alternatively activated express MR, Arginase I, FIZZ-1 and Ym-1 (23). The role of these macrophages alternatively activated by IL-13 in *Candida albicans* killing has been recently described (6, 11). We showed that in a unopsonised context, as found in immunocompromised hosts with no T- and B- cells, IL-13 treated macrophages expressing MR attenuate *C. albicans* proliferation by increasing yeasts phagocytosis and ROIs production *in vitro* (11). Although Th2 cytokines are clearly responsible for macrophage alternative activation *in vitro*, few works shown the involvement of those macrophages in infectious process *in vivo*.

In the present study we used for the first time the *RAG-2^{-/-}* mouse model to evaluate *in vivo* the efficacy of Th2 cytokines and PPAR α ligands in the treatment of mucosal candidiasis in the setting of severe immunosuppression. *RAG-2^{-/-}* animals are genetic knockouts for the recombination activation-2 gene which are unable to join V, D, and J segments to generate functional immunoglobulin or T-cell receptors. They consequently lack mature T- and B- cells and are incapable of mounting either specific antibody or cell-mediated responses. On the other hand, cells involved in the nonspecific immunity such as neutrophils and monocytes are intact and fully functional (25). Here we demonstrated that *RAG-2^{-/-}* are more susceptible to sustained candidiasis colonization of esophagus and cecums than immunocompetent mice. However, these mice do not develop disseminated infection from the sustained colonization and survive for more than 30 days after oral infection. This model closely reproduces mucosal candidiasis found in HIV/AIDS patients. Among these patients with long-standing infection, mucosal surfaces are strongly colonized and esophageal candidiasis is the most frequent opportunistic infection (26). But systemic dissemination rarely occurs in contrast to patients receiving chemotherapy drugs that damage the intestinal mucosa, allowing translocation of *C. albicans* and subsequent dissemination (27). Our results on *RAG-2^{-/-}* mice are consistent with other studies using Severe Combined ImmunoDeficient (SCID) mice inoculated orally with *Candida albicans* which mimics mucosal candidiasis observed clinically in AIDS patients. These mice develop candidiasis in the esophagus, stomach, small intestine, and cecum after oral inoculation, but are as

resistant to systemic candidiasis following i.v. challenge as T-cell-immunocompetent mice (28-31). Thus host defence systems mediated by other cells than B- and T- lymphocytes, such as macrophages, can protect from haematogenous dissemination of *Candida albicans*.

This study demonstrates also that IL-13 and PPAR- α ligands *in vivo* treatments reduce *C. albicans* colonization in esophagus and gastrointestinal tract in immunocompromised *RAG-2^{-/-}* mice and immunocompetent mice. In particular, these treatments are very effective to reduce esophageal candidiasis in immunodeficient *RAG-2^{-/-}* mice. These treatments appear to affect the macrophages, since peritoneal macrophages from IL-13 and PPAR γ ligands-treated immunodeficient or immunocompetent mice have increased phagocytic activity and their capacity to produce ROIs after *C. albicans* challenge. IL-13 and rosiglitazone also trigger the inhibition of *Candida albicans* proliferation by macrophages compared to control (data not shown). These findings enable us to put forth the hypothesis of the effects of our treatments in *Candida albicans* elimination. Our data are consistent with previous *in vitro* studies which demonstrated an essential role for IL-13 and PPAR- α ligands in macrophage activation to eliminate *C. albicans* (6) by increasing capacities of peritoneal macrophages to engulf *C. albicans* and to produce reactive oxygen species secretion during *C. albicans* challenge. Furthermore, we also show that treatment of immunocompetent or immunocompromised *RAG-2^{-/-}* mice with IL-13 are efficient to induce overexpression of mannose receptors on macrophages from peritoneal cavity. This MR overexpression is more elevated in macrophages harvested from *RAG-2^{-/-}* mice according to macrophages from wild type mice. Similarly, the increase of *Candida albicans* phagocytosis by macrophages harvested from *RAG-2^{-/-}* mice treated by rosiglitazone or IL-13 is higher (index of phagocytosis of 70 % for both treatments) compared to macrophages from immunocompetent mice (index of phagocytosis of 49 % for both treatments). As the phagocytosis of yeast by macrophages is an important effector function in the clearance of yeast, the differences in the attenuation effects of IL-13 and rosiglitazone between *RAG-2^{-/-}* and WT mice could be explained by the higher macrophage MR expression and higher phagocytosis in immunodeficient mice after IL-13 or PPAR- α ligand treatments. The existence of a true correlation between the rise of MR expression and enhancement of effector functions of macrophages treated by IL-13 or PPAR γ ligands is supported by the fact that *in vitro* phagocytosis of unopsonised *Candida albicans* and ROIs production during *C. albicans* challenge were blocked by an antisense of MR mRNA (6).

The overexpression of MR was also observed by confocal microscopy on CD68⁺ cells recruited in gastrointestinal mucosa of mice with *C. albicans* infection and after IL-13 treatments. We also provide evidence by confocal microscopic analysis that *Candida albicans* inoculation in gastrointestinal tract triggers the recruitment of CD68⁺ cells (4.2 % of total cells), expressing slightly the MR (2.9 % of total cells) in cecal mucosa attesting the capacity of the yeasts to recruit CD68⁺ cells in the cecum mucosa. These results are consistent with experimental data showing that *Candida albicans* secretes chemotactic factors which favour infiltration of CD68⁺ cells such as macrophages and neutrophils (32).

Moreover, treatments with either rosiglitazone or IL-13 increased the number of CD68⁺MR⁺ cells. These results demonstrate that IL-13 and rosiglitazone treatments favour the infiltration of CD68⁺ cells in the cecal mucosa with a strong proportion of cells expressing the mannose receptor. These cells

infiltrating cecal mucosa will be type 2 macrophages because neutrophils do not express the mannose receptor (33). The weak infiltration by neutrophils in mucosa is also suggested by the weak number of red-labeled cells (CD68⁺) with regard to the yellow-labeled cells (CD68⁺RM⁺) in cecum mucosa. The weak infiltration by neutrophils in mucosa could be due to the fact that PPAR α agonists such as rosiglitazone or 15d-PGJ₂ reduces the degree of neutrophil infiltration under early acute inflammatory conditions in gastrointestinal mucosa (34).

Based i) on the relationship between the increase of the induction of macrophage MR expression after IL-13 or PPAR α treatments, and the increase of effector functions of peritoneal macrophages after *C. albicans* challenge; and ii) on the link between the expression of this receptor and the phagocytosis and the killing of *Candida albicans* via ROIs secretion (6), we put forward the hypothesis that a link could exist between macrophage MR expression in gastrointestinal mucosa, the activation of effector functions of macrophages, and the elimination of *Candida albicans* in oro-gastrointestinal tractus after treatment of mice with IL-13 or PPAR α ligands. Thus, macrophages recruited after infection and activated by IL-13 or PPAR α ligands could fight fungal infection and contribute to eliminate *C. albicans* in the gastrointestinal tract.

Recently we have shown that activation of PPAR γ by IL-13 or rosiglitazone induce MR overexpression and decreases yeasts proliferation *in vitro* (6). Here, our results demonstrate clearly that rosiglitazone, a synthetic PPAR γ ligand, induces in the same way MR expression on recruited mucosal macrophages after infection, and support elimination of *Candida albicans*. PPAR γ is a nuclear receptor linked initially to the regulation of adipogenesis in adipose tissue (35). It was previously shown that PPAR γ can regulate monocyte gene expression and differentiation (16), and that IL-4 and more recently IL-13, induce the expression of the type B scavenger receptor CD36 via PPAR γ activation (16, 36-38), contributing to facilitate the phagocytosis of *Plasmodium falciparum*-parasitized erythrocytes (38) and to decrease malaria-induced TNF- α secretion (39). In addition of CD36 overexpression, PPAR γ plays a critical role in the regulation of cholesterol homeostasis by controlling the expression of a network of genes that mediate cholesterol efflux from cells and its transport in plasma. Then, PPAR γ induces ABCA1 expression and cholesterol removal from macrophages through a transcriptional cascade mediated by the nuclear receptor Liver-X-Receptor alpha (LXR- α), where ligand activation of PPAR γ leads to primary induction of ABCA1 (40, 41). It is interesting to note that recent findings have established that genomic interrelationships between genes coding for PPAR γ and LXR- α regulate innate immune response against pathogens by exerting both positive and negative regulation of specific macrophage gene expression networks (40, 42, 43). Thus, LXR displays anti-inflammatory activities and promotes macrophage survival in bacterial infection settings (44). These data reinforce our study suggesting the involvement of PPAR γ in elimination of gastrointestinal candidiasis.

Indeed, the treatment of mice with GW9662, a specific and irreversible PPAR γ antagonist, and the use of PPAR γ ^{+/-} mice show the involvement of PPAR γ in effects of IL-13 treatments on the rise of MR expression, ROIs secretion and phagocytosis. Moreover we demonstrated too that IL-13 and PPAR γ

ligands induce half the increase of MR expression and reduce with less effectiveness the gastrointestinal tract colonization by yeasts in PPAR γ ^{+/-} mice. As demonstrated by western blot and PCR, PPAR γ ^{+/-} mice express the half of PPAR γ protein or mRNA respectively, compared to homozygous PPAR γ ^{+/+} mice (45). This heterozygous model was yet implied to study physiological effects of PPAR γ deficiency in mice, and for example to underlie the role of PPAR γ in the therapeutic effects of 5-aminosalicylic acid as an anti-inflammatory drug used in the treatment of bowel diseases (46). Finally, we demonstrated that pretreatment of animals with the specific PPAR γ antagonist completely inhibits the protective effects of IL-13 and rosiglitazone against *C. albicans* gastrointestinal colonization and abolishes MR induction. Other studies have shown that co-administration of GW9662 and rosiglitazone *in vivo* abrogated the protective effect of rosiglitazone or 15d-PGJ₂ on organ injury and dysfunction associated with septic shock (47-49). This synthetic antagonist of PPAR γ acts while fixing irreversibly itself in the PPAR α ligand-binding pocket through covalent modification of Cys²⁸⁵, then prohibiting fixation of PPAR α ligand and activation of this transcription factor (50). As we published in our precedent work, GW9662 have no effect on basal expression of MR. This pharmacological antagonist only inhibit the induction of MR expression by IL-13 and rosiglitazone (6). These results suggest that, as previously indicated, in our experimental conditions, PPAR γ is only involved in up-regulation of MR in particular by IL-13, and not in its basal expression. This point is particularly important to explain the role of PPAR α in infection. PPAR γ will be only involved in infectious process if it is activated by its ligands. These ligands can be rosiglitazone (synthetic ligand), or 15d-PGJ₂ a natural ligand produced in the cell in response to IL-13 treatment (6, 38).

This conclusion is sustained by our data which show that PPAR γ ^{+/-} mice did not show any difference in susceptibility to *Candida albicans* infection compared to PPAR γ ^{+/+} mice. Furthermore, the expression level of mannose receptor from PPAR γ ^{+/-} mice is not lower in comparison with the WT. These experimental data and those obtained with GW9662 suggest that PPAR γ should not be the only transcription factor involved in mannose receptor regulation. PPAR γ would play a role in mannose receptor expression and infectious process only when it would be activated by its ligand fixation. While it was established that genetic variation in the PPAR γ gene alters body weight control, lipid and insulin homeostasis, and the susceptibility to type 2 diabetes (51) our data suggest that PPAR α activation potentiates macrophages effector functions, and contributes in reducing yeasts colonization but would not be a host factor involved in susceptibility to *Candida albicans* in our mice model of oro-gastrointestinal infection. However, other studies are necessary to confirm this hypothesis.

In conclusion, the present results reinforce our previous *in vitro* works which shown that IL-13 activate PPAR γ via a cPLA₂ activation, production and localisation of endogen 15d-PGJ₂ to the macrophage nucleus in mouse (6) and in human monocytes (38). It shows that IL-13 and the ligands of the nuclear receptor PPAR γ can also act *in vivo* since it contributes to reduce an esophageal and gastrointestinal candidiasis in immunocompetent and with a effective effect in immunodeficient RAG-2^{-/-} mice. Thus, activation of PPAR γ could be an effective treatment of esophageal candidiasis in hospitalized patients or patients with compromised immune systems.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are grateful to A. Minty and Sanofi-Synthelabo Toulouse Labège for supplying IL-13. The authors thank Sophie Cassaing for helpful discussions and Valérie Bans, Philippe Batigne, Alain Jauneau and Yves Martinez for technical assistance.

FOOTNOTES

A.Coste was supported by SIDACTION, C. Lagane by the French Ministry of the Education Nationale de la Recherche et de la Technologie; This work was also supported by a grant from the Tarn et Garonne Committee of the Ligue Contre le Cancer.

To whom correspondence should be addressed : Dr Bernard Pipy, EA2405, Macrophages, Mediateurs de l'Inflammation et Interactions Cellulaires, Université Paul Sabatier Toulouse III, INSERM IFR31, Institut Louis Bugnard, BP 84225 - 31432 Toulouse cedex 4, France.

Fax : 33 5 61 32 22 30. E-mail : pipy@toulouse.inserm.fr

REFERENCES

1. Dupont, P. F. 1995. *Candida albicans*, the opportunist. A cellular and molecular perspective. *Journal of the American Podiatric Medical Association* 85:104-115.
2. Stahl, P. D., and R. A. Ezekowitz. 1998. The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Current opinion in immunology* 10:50-55.
3. Ezekowitz, R. A., K. Sastry, P. Bailly, and A. Warner. 1990. Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *The Journal of experimental medicine* 172:1785-1794.
4. Ezekowitz, R. A., D. J. Williams, H. Koziel, M. Y. Armstrong, A. Warner, F. F. Richards, and R. M. Rose. 1991. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature* 351:155-158.
5. Kabha, K., L. Nissimov, A. Athamna, Y. Keisari, H. Parolis, L. A. Parolis, R. M. Grue, J. Schlepper-Schafer, A. R. Ezekowitz, D. E. Ohman, and et al. 1995. Relationships among capsular structure, phagocytosis, and mouse virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *Infection and immunity* 63:847-852.
6. Coste, A., M. Dubourdeau, M. D. Linas, S. Cassaing, J. C. Lepert, P. Balard, S. Chalmeton, J. Bernad, C. Orfila, J. P. Seguela, and B. Pipy. 2003. PPARgamma promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13. *Immunity* 19:329-339.
7. Yamamoto, Y., T. W. Klein, and H. Friedman. 1997. Involvement of mannose receptor in cytokine interleukin-1beta (IL-1beta), IL-6, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor responses, but not in chemokine macrophage inflammatory protein 1beta (MIP-1beta), MIP-2, and KC responses, caused by attachment of *Candida albicans* to macrophages. *Infection and immunity* 65:1077-1082.
8. Clohisy, D. R., Z. Bar-Shavit, J. C. Chappel, and S. L. Teitelbaum. 1987. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates bone marrow macrophage precursor proliferation and differentiation. Up-regulation of the mannose receptor. *The Journal of biological chemistry* 262:15922-15929.
9. Schreiber, S., S. L. Perkins, S. L. Teitelbaum, J. Chappel, P. D. Stahl, and J. S. Blum. 1993. Regulation of mouse bone marrow macrophage mannose receptor expression and activation by prostaglandin E and IFN-gamma. *J Immunol* 151:4973-4981.
10. Raveh, D., B. A. Kruskal, J. Farland, and R. A. Ezekowitz. 1998. Th1 and Th2 cytokines cooperate to stimulate mannose-receptor-mediated phagocytosis. *Journal of leukocyte biology* 64:108-113.
11. Coste, A., M. D. Linas, S. Cassaing, J. Bernad, S. Chalmeton, J. P. Seguela, and B. Pipy. 2002. A sub-inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon-gamma- and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 49:731-740.
12. Finkelman, F. D., T. Shea-Donohue, S. C. Morris, L. Gildea, R. Strait, K. B. Madden, L. Schopf, and J. F. Urban, Jr. 2004. Interleukin-4- and interleukin-13-mediated host protection against intestinal nematode parasites. *Immunological reviews* 201:139-155.
13. Heydeck, D., L. Thomas, K. Schnurr, F. Trebus, W. E. Thierfelder, J. N. Ihle, and H. Kuhn. 1998. Interleukin-4 and -13 induce upregulation of the murine macrophage 12/15-lipoxygenase activity: evidence for the involvement of transcription factor STAT6. *Blood* 92:2503-2510.
14. de Waal Malefyt, R., C. G. Figdor, R. Huijbens, S. Mohan-Peterson, B. Bennett, J. Culpepper, W. Dang, G. Zurawski, and J. E. de Vries. 1993. Effects of IL-13 on phenotype, cytokine production, and cytotoxic function of human monocytes. Comparison with IL-4 and modulation by IFN-gamma or IL-10. *J Immunol* 151:6370-6381.
15. Forman, B. M., P. Tontonoz, J. Chen, R. P. Brun, B. M. Spiegelman, and R. M. Evans. 1995. 15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma. *Cell* 83:803-812.
16. Tontonoz, P., L. Nagy, J. G. Alvarez, V. A. Thomazy, and R. M. Evans. 1998. PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell* 93:241-252.
17. Terabe, M., T. Kuramochi, T. Hatabu, M. Ito, Y. Ueyama, K. Katakura, S. Kawazu, T. Onodera, and Y. Matsumoto. 1999. Non-ulcerative cutaneous lesion in immunodeficient mice with *Leishmania amazonensis* infection. *Parasitology international* 48:47-53.
18. Mondon, P., M. P. Brenier, F. Symoens, E. Rodriguez, E. Coursange, F. Chaib, B. Lebeau, M. A. Piens, A. M. Tortorano, M. Mallie, F. Chapuis, A. Carlotti, J. Villard, M. A. Viviani, N. Nolard,

- J. M. Bastide, P. Ambroise-Thomas, and R. Grillot. 1997. Molecular typing of *Aspergillus fumigatus* strains by sequence-specific DNA primer (SSDP) analysis. *FEMS immunology and medical microbiology* 17:95-102.
19. Einsele, H., H. Hebart, G. Roller, J. Löffler, I. Rothenhofer, C. A. Müller, R. A. Bowden, J. van Burik, D. Engelhard, L. Kanz, and U. Schumacher. 1997. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *Journal of clinical microbiology* 35:1353-1360.
 20. Tuite, A., A. Mullick, and P. Gros. 2004. Genetic analysis of innate immunity in resistance to *Candida albicans*. *Genes and immunity* 5:576-587.
 21. Vazquez-Torres, A., and E. Balish. 1997. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* 61:170-192.
 22. Mantovani, A., S. Sozzani, M. Locati, P. Allavena, and A. Sica. 2002. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology* 23:549-555.
 23. Gordon, S. 2003. Alternative activation of macrophages. *Nature reviews* 3:23-35.
 24. Romani, L. 2000. Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism. *Journal of leukocyte biology* 68:175-179.
 25. Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, A. M. Stall, and et al. 1992. RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement. *Cell* 68:855-867.
 26. de Repentigny, L., D. Lewandowski, and P. Jolicoeur. 2004. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clinical microbiology reviews* 17:729-759, table of contents.
 27. Kullberg, B. J., and A. M. Oude Lashof. 2002. Epidemiology of opportunistic invasive mycoses. *European journal of medical research* 7:183-191.
 28. Clemons, K. V., and D. A. Stevens. 2000. Treatment of orogastrointestinal candidosis in SCID mice with fluconazole alone or in combination with recombinant granulocyte colony-stimulating factor or interferon-gamma. *Med Mycol* 38:213-219.
 29. Clemons, K. V., and D. A. Stevens. 2001. Efficacy of ravuconazole in treatment of mucosal candidosis in SCID mice. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 45:3433-3436.
 30. Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, T. Warner, and E. Balish. 1995. Nitric oxide enhances resistance of SCID mice to mucosal candidiasis. *The Journal of infectious diseases* 172:192-198.
 31. Narayanan, R., W. A. Joyce, and R. A. Greenfield. 1991. Gastrointestinal candidiasis in a murine model of severe combined immunodeficiency syndrome. *Infection and immunity* 59:2116-2119.
 32. Edens, H. A., C. A. Parkos, T. W. Liang, A. J. Jesaitis, J. E. Cutler, and H. M. Miettinen. 1999. Non-serum-dependent chemotactic factors produced by *Candida albicans* stimulate chemotaxis by binding to the formyl peptide receptor on neutrophils and to an unknown receptor on macrophages. *Infection and immunity* 67:1063-1071.
 33. Zhu, K., and U. Mrowietz. 2005. Enhancement of antibacterial superoxide-anion generation in human monocytes by fumaric acid esters. *Archives of dermatological research* 297:170-176.
 34. Villegas, I., A. R. Martin, W. Toma, and C. A. de la Lastra. 2004. Rosiglitazone, an agonist of peroxisome proliferator-activated receptor gamma, protects against gastric ischemia-reperfusion damage in rats: role of oxygen free radicals generation. *European journal of pharmacology* 505:195-203.
 35. Tontonoz, P., E. Hu, and B. M. Spiegelman. 1995. Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Current opinion in genetics & development* 5:571-576.
 36. Huang, J. T., J. S. Welch, M. Ricote, C. J. Binder, T. M. Willson, C. Kelly, J. L. Witztum, C. D. Funk, D. Conrad, and C. K. Glass. 1999. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 400:378-382.
 37. Nagy, L., P. Tontonoz, J. G. Alvarez, H. Chen, and R. M. Evans. 1998. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 93:229-240.
 38. Berry, A., P. Balard, A. Coste, D. Olganier, C. Lagane, H. Authier, F. Benoit-Vical, J. C. Lepert, J. P. Seguela, J. F. Magnaval, P. Chambon, D. Metzger, B. Desvergne, W. Wahli, J. Auwerx, and B. Pipy. 2007. IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPARgamma activation. *European journal of immunology* 37:1642-1652.
 39. Serghides, L., and K. C. Kain. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-retinoid X receptor agonists increase CD36-dependent phagocytosis of Plasmodium

- falciparum-parasitized erythrocytes and decrease malaria-induced TNF-alpha secretion by monocytes/macrophages. *J Immunol* 166:6742-6748.
40. Chawla, A., W. A. Boisvert, C. H. Lee, B. A. Laffitte, Y. Barak, S. B. Joseph, D. Liao, L. Nagy, P. A. Edwards, L. K. Curtiss, R. M. Evans, and P. Tontonoz. 2001. A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Molecular cell* 7:161-171.
 41. Akiyama, T. E., S. Sakai, G. Lambert, C. J. Nicol, K. Matsusue, S. Pimprale, Y. H. Lee, M. Ricote, C. K. Glass, H. B. Brewer, Jr., and F. J. Gonzalez. 2002. Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux. *Molecular and cellular biology* 22:2607-2619.
 42. Kaul, D., and P. K. Anand. 2003. Regulation of PPAR-gamma gene in human promyelocytic HL-60 cell line. *Leukemia research* 27:683-686.
 43. Kaul, D., A. Gautam, and K. Sikand. 2006. Importance of LXR-alpha transcriptome in the modulation of innate immunity. *Molecular and cellular biochemistry* 292:53-57.
 44. Valledor, A. F. 2005. The innate immune response under the control of the LXR pathway. *Immunobiology* 210:127-132.
 45. Rieusset, J., J. Seydoux, S. I. Anghel, P. Escher, L. Michalik, N. Soon Tan, D. Metzger, P. Chambon, W. Wahli, and B. Desvergne. 2004. Altered growth in male peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) heterozygous mice: involvement of PPARgamma in a negative feedback regulation of growth hormone action. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* 18:2363-2377.
 46. Rousseaux, C., B. Lefebvre, L. Dubuquoy, P. Lefebvre, O. Romano, J. Auwerx, D. Metzger, W. Wahli, B. Desvergne, G. C. Naccari, P. Chavatte, A. Farce, P. Bulois, A. Cortot, J. F. Colombel, and P. Desreumaux. 2005. Intestinal antiinflammatory effect of 5-aminosalicylic acid is dependent on peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *The Journal of experimental medicine* 201:1205-1215.
 47. Collin, M., N. S. Patel, L. Dugo, and C. Thiemermann. 2004. Role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in the protection afforded by 15-deoxydelta12,14 prostaglandin J2 against the multiple organ failure caused by endotoxin. *Critical care medicine* 32:826-831.
 48. Dugo, L., M. Collin, S. Cuzzocrea, and C. Thiemermann. 2004. 15d-prostaglandin J2 reduces multiple organ failure caused by wall-fragment of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *European journal of pharmacology* 498:295-301.
 49. Liu, D., B. X. Zeng, S. H. Zhang, Y. L. Wang, L. Zeng, Z. L. Geng, and S. F. Zhang. 2005. Rosiglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma agonist, reduces acute lung injury in endotoxemic rats. *Critical care medicine* 33:2309-2316.
 50. Leesnitzer, L. M., D. J. Parks, R. K. Bledsoe, J. E. Cobb, J. L. Collins, T. G. Consler, R. G. Davis, E. A. Hull-Ryde, J. M. Lenhard, L. Patel, K. D. Plunket, J. L. Shenk, J. B. Stimmel, C. Therapontos, T. M. Willson, and S. G. Blanchard. 2002. Functional consequences of cysteine modification in the ligand binding sites of peroxisome proliferator activated receptors by GW9662. *Biochemistry* 41:6640-6650.
 51. Kadowaki, T., K. Hara, T. Yamauchi, Y. Terauchi, K. Tobe, and R. Nagai. 2003. Molecular mechanism of insulin resistance and obesity. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J)* 228:1111-1117.

1.3. Conclusions et perspectives

Dans ce travail, nous avons montré *in vivo* la capacité des macrophages activés par l'IL-13 et les ligands de PPAR- γ à diminuer une candidose gastro-intestinale induite chez la souris. En effet, si l'infection digestive semble nécessaire à elle seule au recrutement de macrophages à la muqueuse digestive, les traitements par l'IL-13 ou les thiazolidinediones (TZDs) telles que la rosiglitazone amplifient ce recrutement, et augmentent l'expression du récepteur mannose (RM) à la surface des phagocytes recrutés. Parallèlement, nous avons montré que ces traitements sont corrélés à la diminution de la colonisation du tractus gastro-intestinal par la levure, ainsi qu'à l'augmentation de l'expression du récepteur mannose et des fonctions anti-infectieuses des macrophages chez des animaux immunocompétents, mais aussi chez des animaux immunodéficients. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'IL-13, et peut être plus encore les ligands de PPAR- γ , pourraient être considérés dans le traitement des candidoses gastro-intestinales chez les patients immunodéprimés.

Le MR est un PRR qui joue un rôle capital dans la phagocytose des pathogènes non opsonisés présentant des résidus mannose à leur surface, tels que *C. albicans*. Au laboratoire, un lien direct entre l'expression du MR, l'augmentation des capacités anti-infectieuses des macrophages vis-à-vis de *C. albicans*, et l'élimination de cet agent pathogène a été mis en évidence *in vitro*. Pour cela, des ARNm antisens du MR ainsi que de la BSA mannosylée soluble avaient été utilisés [115, 147]. En revanche, dans la littérature il est décrit chez le macrophage humain que l'hyperactivité oxydative induite par la phagocytose de l'agent pathogène serait médiée non pas par le MR, mais par le récepteur aux β -glucanes Dectine-1 [385]. D'autres études ont montré *ex vivo*, grâce à des souris déficientes pour le MR, que d'autres récepteurs étaient capables de médier l'internalisation de *C. albicans* [386]. En effet, en l'absence de ce récepteur, le pathogène est tout de même internalisé grâce à la mise en place d'une voie alternative qui impliquerait le récepteur Dectine-1.

Dans ce travail, nous avons pu établir une relation entre l'augmentation du MR à la surface des macrophages péritonéaux des souris traitées et la phagocytose des levures par ces mêmes cellules, grâce à un calcul des coefficients de corrélation entre les index de phagocytose et le niveau d'expression des MR. Cependant aucun rapport direct n'a pu être observé *in vivo* entre les fonctions candidicides des macrophages, l'élimination du pathogène et l'expression du MR. C'est la raison pour laquelle nous allons utiliser des animaux déficients conditionnels pour ce MR, construits selon un système de recombinaison homologue « Cre-LoxP ». Chez la lignée murine générée, les exons 13, 14 et 15, codant pour le domaine 4 lectine C (CRD4) du MR, principal domaine lectine impliqué dans la reconnaissance du mannose, seront encadrés par des séquences loxP « floxées ». Ces animaux seront croisés avec des souris Lys-CRE possédant le gène de la recombinase CRE derrière le promoteur du lysozyme. Ce système permettra d'invalider le gène du MR spécifiquement dans les macrophages. Ainsi, nous observerons l'effet des traitements par les ligands de PPAR- γ ou l'IL-13 sur les fonctions anti-infectieuses des macrophages péritonéaux de ces animaux en mesurant *ex vivo* d'une part la phagocytose des levures par ces cellules, et d'autre part leur capacité à produire des IROs. Nous observerons aussi la colonisation du tractus gastro-intestinal par la levure comme cela a

été décrit précédemment. Au terme de cette étude, nous devrions avoir établi s'il existe un lien direct ou non entre le MR et les fonctions anti-infectieuses des macrophages.

Nous étudierons aussi l'implication de Dectin-1 en utilisant des souris dont le gène de ce récepteur a été invalidé dans les macrophages par recombinaison homologue dans un système « Cre-LoxP ». Chez la lignée murine générée, le gène codant pour le récepteur Dectin-1 sera spécifiquement invalidé au niveau des macrophages. Pour cela, les exons 4, 5, et 6 codant pour le seul domaine lectine C du récepteur seront encadrés par des séquences loxP « floxées ». Ces animaux seront croisés avec des souris Lys-CRE permettant de contrôler l'invalidation de ce gène de façon tissu-spécifique dans les macrophages.

Ces deux types de souris KO sont actuellement en reproduction à l'ICS-IGBMC de Strasbourg.

Dans le précédent travail, nous nous sommes intéressés à l'élimination d'une candidose digestive induite par gavage chez des animaux immunocompétents, mais aussi immunodéprimés RAG-2^{KO}. Chez ces souris, qui reproduisent les immunodépressions rencontrées chez certains patients chez lesquels les candidoses sont fréquentes et difficilement contrôlables par les traitements usuels, nous avons pu observer une diminution significative de la colonisation du tractus gastro-intestinal par la levure après traitements avec les ligands de PPAR- γ ou avec l'IL-13. Ces résultats soulignent l'intérêt des ligands de PPAR- γ , déjà utilisés en thérapeutique humaine, dans l'élimination de *C. albicans* via l'induction du MR.

C'est la raison pour laquelle étudier l'effet des traitements par les ligands de PPAR- γ ou par l'IL-13 sur des monocytes humains constituera l'objet du second article de recherche présenté. Afin de montrer que notre modèle s'applique à l'homme, nous nous intéresserons tout d'abord à des monocytes humains prélevés chez des sujets sains. Nous déterminerons le rôle de PPAR- γ dans l'induction du MR (GW 9662, RNAi), et le rôle de ce récepteur (antisens du MR) dans la phagocytose et la production d'IROs. Ce travail ouvrira la voie plus tard à une étude sur des monocytes issus de patients présentant des immunodépressions sévères. Ce modèle cellulaire permettra *in vitro* de souligner l'intérêt thérapeutique que pourraient constituer les ligands de PPAR- γ et l'IL-13 dans la résolution d'une candidose chez l'immunodéprimé.

2- L'IL-13 et les ligands de PPAR- γ
augmentent les fonctions anti-
effectrices des monocytes humains
contre *Candida albicans* mais agissent
différemment sur l'expression du
récepteur mannose

2.1. Introduction

Nous avons montré *in vitro* au laboratoire et *in vivo* dans le travail précédent, que les ligands de PPAR- γ et l'IL-13 augmentent l'expression du récepteur mannose des macrophages *via* l'activation du facteur de transcription PPAR- γ . Ce phénomène a pour conséquence la potentialisation des fonctions anti-infectieuses des macrophages telles que la sécrétion de radicaux libres oxygénés et la phagocytose, et conduit à l'élimination de *Candida albicans*, champignon opportuniste, *in vitro* et *in vivo*. Ces travaux nous ont permis d'envisager les ligands de PPAR- γ et l'IL-13 comme de potentiels agents thérapeutiques dans le traitement des candidoses aiguës rencontrées chez le patient immunodéprimé.

Les résultats présentés dans la partie suivante ont pour objectif de valider l'intérêt de nos travaux chez l'homme. Pour cela, nous nous sommes intéressés dans une première partie à l'étude des fonctions effectrices anti-*Candida* des monocytes humains en réponse à l'IL-13 et aux ligands de PPAR- γ . Nous avons montré que, comme pour les macrophages murins, ces traitements potentialisent les fonctions anti-infectieuses des monocytes humains à savoir la phagocytose des agents pathogènes et la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène. L'utilisation du GW 9662, un antagoniste spécifique et irréversible de PPAR- γ montre que comme chez la souris, ce phénomène dépend de l'activation du facteur de transcription PPAR- γ .

Nous nous sommes donc par la suite intéressés à la régulation de l'expression du récepteur mannose par ces traitements. De façon surprenante, nous avons pu mettre en évidence une différence de réponse des monocytes humains entre les stimulations à l'IL-13 et aux ligands de PPAR- γ . En effet, le récepteur mannose n'est induit que par l'IL-13 mais pas par les ligands de ce récepteur nucléaire.

La seconde partie de ce travail a donc été consacrée à l'étude de la régulation de l'expression du récepteur mannose par l'IL-13. Grâce à l'utilisation d'antagonistes et de siRNA de PPAR- γ , nous avons pu montrer que ce facteur de transcription était impliqué dans la régulation de l'expression du récepteur mannose par l'IL-13, mais pas par la rosiglitazone. Ce travail est encore sous investigation et nécessite l'approfondissement de l'étude des voies de régulations du récepteur mannose qui semblent être différentes entre l'homme et la souris.

2.2. Travaux de recherche 2

IL-13 And PPAR- γ Ligands Promote Effective Functions Of Human Monocytes Against *Candida albicans* But Act Differently On Mannose Receptor Expression

Céline Lagane¹, Amandine Galès¹, Clément Castella¹, Agnès Coste^{1,2}, Patricia Balard¹, José Bernad¹, Jean-Claude Lepert¹, Marie-Denise Linas^{1,3}, Bernard Pipy^{1#}

¹ Polarisation des Macrophages et Récepteurs Nucléaires dans les pathologies inflammatoires et infectieuses, EA2405, Université Paul Sabatier Toulouse III, INSERM IFR31, BP 87832 Toulouse Cedex 4, France

² Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/ INSERM/Université Louis Pasteur, 1 rue Laurent Fries, BP 10142 – 67404 Illkirch Cedex, France.

³ Département de Parasitologie et Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Hôpital Rangueil, TSA 50032 - 31059 Toulouse Cedex 9, France.

INTRODUCTION

Candida albicans is part of the microbial flora that colonizes the mucocutaneous surfaces of the oral cavity and gastrointestinal tract of many mammals as well as other organisms [1]. This yeast represents a serious issue in the immunocompromised patients and those undergoing immunosuppressive therapies, particularly with impaired phagocytic cell function (mainly neutrophils, monocytes and macrophages). The innate immune system initiated by monocytes / macrophages (MΦs), belonging to the mononuclear phagocyte system [2], is therefore essential for orchestrating events associated with prevention of fungal colonization. Monocytes / macrophages play a direct role in microbial killing through their capacities to phagocytize yeasts [3] and to exert their fungicidal activity by releasing large amounts of highly toxic molecules such as reactive oxygen and nitrogen intermediates (ROIs and RNIs) [4]. We previously showed *in vitro* that murine macrophages have increased fungicidal activities against *Candida albicans* upon treatments with IL-13 or PPAR- γ ligands via PPAR- γ activation [5].

Activation process of monocytes / macrophages is initiated by the recognition of pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) by pattern-recognition receptors expressed on the surface of phagocytes [6]. Mannose receptor (MR) is an important PRR able to mediate phagocytosis of pathogenic agents that exhibit mannose motives at their surface [7], such as *Candida albicans*. So, the modulation of the expression of this receptor may be critical in the role of these cells in phagocytosis, antigen processing, and host defence.

Mannose receptor regulation has been well studied in murine macrophages. Indeed, the expression of this transmembrane protein can be up-regulated by several substances including Th2 cytokines such as IL-4 [8, 9] and IL-13 [5, 8, 10], IL-10 [11], IFN- α and - β [12], 1,25-dihydroxyvitamin D3 [13, 14] and prostaglandin E [15, 16] and down-regulated by IFN- γ [8, 17], pathogenic agents and their products. We have previously shown on peritoneal murine macrophages *in vitro* [5] and *in vivo* (unpublished data) that mechanisms of mannose receptor up-regulation by IL-13 involve activation of the transcription factor PPAR- γ *via* activation of a cytosolic PLA₂ and generation of 15-deoxy- Δ^{12-14} prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), a natural PPAR γ ligand. These mechanisms lead to enhancement of macrophages effective functions such as phagocytosis and reactive oxygen species secretion, and favour elimination of *Candida albicans* by murine macrophages or of gastrointestinal tract of mice in a digestive colonisation model. But little is known about regulation of mannose receptor expression in human monocytes and its role in candidiasis resolution.

PPAR- γ is a member of a family of ligand-activated nuclear transcription factors that form heterodimers with the retinoic X receptors (RXR), and binds to PPAR responsive elements (PPREs) in the promoter regions of target genes [18]. PPAR- γ can be activated by a range of natural and synthetic substances, including modified fatty acids, members of the prostanoid family, in particular 15d-PGJ₂, linoleic acid derivatives [19, 20] and insulin-sensitizing thiazolidinediones compounds (TZDs) such as rosiglitazone, pioglitazone and troglitazone [21-23]. While the role of PPAR γ in the regulation of adipogenesis [24], lipid homeostasis [25] and monocyte gene expression and differentiation [26, 27] is relatively well established, its involvement in antimicrobial defence has only been explored in mice.

Several arguments suggest the possibility that PPAR γ could be involved in innate immune responses against pathogenic agents. Firstly, it has been shown in murine macrophages that Th2 cytokines are implicated in the overexpression of PRRs acting in host defence. It has previously been shown in murine macrophages that IL-13 up-regulates MR [5] and that IL-4 promotes CD36 expression [28], a scavenger receptor able to mediate phagocytosis of erythrocytes parasited by *Plasmodium falciparum*. These effects are mediated by production of PPAR γ endogenous ligand and activation of this nuclear receptor. More recently, up-regulation of CD36 expression by IL-13 *via* PPAR γ activation was confirmed in human blood monocytes [29] demonstrating that PPAR γ have a potent immunostimulatory role on human innate immune cells.

In this study, we demonstrate that, as in murine peritoneal macrophages, IL-13 and rosiglitazone potentate macrophage anti-infectious functions such as phagocytosis and reactive oxygen species release leading to *Candida albicans* elimination *in vitro*. As in our precedent work on murine cells, this raise of antifungic properties is inhibited by GW9662, a specific and irreversible antagonist of PPAR- γ , or in PPAR- $\gamma^{+/-}$ mice, suggesting the role of this transcription factor in this anti-infectious effect. In contrast we show, contrary to mice cells, a difference of responsiveness of IL-13 and rosiglitazone on MR up-regulation, suggesting on one hand that another receptor than MR can be involved in human monocytes anti-infectious properties, and on the other hand that MR regulation should be different in mice and in human cells.

MATERIALS AND METHODS

Media and Reagents

Ficoll-Hypaque was from AbCys (Paris, France). PBS without calcium or magnesium, Macrophage-Serum Free Medium (SFM), optimized for monocytes / MΦs culture and TRIzol Reagent were from Invitrogen Corporation (Cergy Pontoise, France). Paraformaldehyde, isopropanol, and ethanol were from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Triton X-100 was from Merck Sharp (Riom, France). Rosiglitazone, GW9662, T0070907 and MAFP were from Cayman Chemical (Ann Arbor, USA). AG490 was from Biomol International LP (Plymouth, USA). IL-13 was from Sanofi Synthelabo (Labège, France). R-PE conjugated mouse monoclonal antibodies against CD206 and CD36 were from BD Pharmingen (Pont de Claix, France). siRNA transfection reagent and PPAR- γ siRNA were purchased from Santa-Cruz Biotechnologies (Heidelberg, Germany).

Cell culture

Mononuclear cells were obtained from buffy coats of healthy blood donors by a standard Ficoll-Hypaque gradient method. Human monocytes were isolated from mononuclear cells by adherence to culture dishes for 2h, at 37°C with 5% CO₂, in special macrophage serum-free medium (SFM), with 10 % of L-glutamine and 0,1% of antibiotics (Peni-streptomycin). Nonadherent cells were removed by washing with PBS medium, and the remaining adherent cells (>90 % monocytes) were incubated in SFM supplemented with L-glutamine and peni-streptomycin (except for transfection protocols). Monocytes monolayers will be used to investigate ROS production, phagocytosis capacities and to evaluate MR or CD36 surface expression.

Cell treatments

After 2 hours of cell adhesion and elimination of nonadherent cells by washing, monocytes were treated with IL-13 (20ng/ml), rosiglitazone (5 μ M) and/or GW9662 (1 μ M) or T0070907 (1 μ M) or AG490 (10 μ M) during 18-24 hours in SFM supplemented with 10 % of L-glutamine and 0,1 % of antibiotics.

Microorganisms

The strain of *Candida albicans* used throughout these experiments was isolated from a blood culture of a Toulouse – Rangueil Hospital patient. The isolate was identified as *Candida albicans* based on common laboratory criteria and cultured on Sabouraud dextrose agar (SDA) plates containing gentamicin and chloramphenicol. *Candida albicans* was maintained by transfers on SDA plates. Growth from 18 to 24 h SDA culture of *Candida albicans* was suspended in sterile saline and adjusted to the wanted concentration, as determined by hemacytometer counts and verified by plate counts.

ROS production measurements

1,5 x 10⁵ mononuclear cells were placed in a 96-well microplate and treated or not as described previously. ROS production was measured by chemiluminescence in presence of 5-amino-2,3-dihydro-1,4-phthalazinedione (Luminol, Sigma) using a thermostatically controlled (37°C) luminometer (Wallac 1420 Victor², Finland). The generation of chemiluminescence was monitored continuously for

30 min after incubation of the cells with luminal (66 μ M) in basal conditions, then for 90 min in presence of *Candida albicans* blastospores in a ratio of (3 : 1). Statistical analysis were performed using the area under the curves expressed in counts x s.

Phagocytosis assays

2×10^5 mononuclear cells were placed in a 96-well black microplate and treated or not as described previously. Yeasts of *Candida albicans* tagged with FITC were added in the cell culture at a ration of (3 : 1), and the plate was placed at 37°C in a humidified atmosphere containing 5 % CO₂. Phagocytosis of yeasts was performed by measurement of the fluorescence emission with a thermostatically controlled (37°C) fluorimeter (Wallac 1420 Victor², Finland).

Flow cytometry

10^6 mononuclear cells were placed in a 24-well plate and treated or not as described previously. After washing, 500 μ l of PBS-EDTA (5mM) were added 10 min at room temperature. Then scrapping was realized to collect the cells in flow cytometry tubes. PBS was added and centrifugation at 15000 tr/min during 5 min was performed to wash cells. PBS was emptied and 5 μ l of anti-CD206-PE or anti-CD36-PE antibodies were added. Cells were incubated during 20 min in obscurity. Then, 2 ml of PBS were added and a centrifugation was performed at 15000 tr/min during 5 min. PBS was emptied and 300 μ l of FACS-Flow were added. In order to facilitate the selection of viable cell population a staining with propidium iodide was done. All analyzes were done on a Becton-Dickinson FACSCalibur using CellQuest software. A population of 20,000 viable cells was analyzed for each data point.

RT-PCR

10^6 mononuclear cells were plated in a 24-well plate at density of 110 cells/mm² and treated or not as described previously. After incubation the extraction RNA was done by using TRIzol reagent and purification by chloroform / isopropanol / ethanol procedure. The reverse transcription was performed by First-strand cDNA Synthesis Kit (Promega, Charbonnières-les-bains, France). PCR for PPAR- γ , MR, CD36 and β -actin cDNA was performed with the LC FastStart DNA master SYBER Green I (Roche Diagnostics, Meylan, France). Amplification and detection were performed in a LightCycler system (Roche Diagnostics, Meylan, France) as follows. 20 μ l of reaction mixture was incubated initially for 8 min at 95°C to active the Fast Start Taq DNA; amplifications were performed for 40 cycles (15 s at 95°C and 30 s at 69°C) for PPAR- γ , MR, CD36 and β -actin. Primers were designed with the software Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, USA). The primers were: 5'- CGC TAC TAG GCA ATG CCA ATG -3' (sens) and 5'- CGT GCA ATC TGC GTA CCA CT -3' (antisense) for MR, 5'- GGA GCG GGT GAA GAC TCA TG -3' (sens) and 5'- TTG TCA CGG AAC ACG TGC A -3' (antisens) for PPAR γ , 5'-TGT AAC CCA GGA CGC TGA GG-3' (sense) and 5'-GAA GGT TCG AAG ATG GCA CC-3' (antisense) for CD36 ; 5'-CCT CAC CCT GAA GTA CCC CA-3' (sense) and 5'- TGC CAG ATT TTC TCC ATG TCG -3' (antisense) for β -actin. Results of the real time PCR data were represented as Ct values as described [30].

Transfection assays

Cell culture was performed in serum-free medium without antibiotics. Volumes given are for one well of a 24-well plate containing 10^6 cells. First, one solution A containing 4 μ l of PPAR γ siRNA (Santa Cruz, Tebu, France) and 21 μ l of SFM was mixed. The same mix was performed for mismatch siRNA control (Santa Cruz, Tebu, France). In another solution B 1.5 μ l of transfecting agent was mixed with 23.5 μ l of SFM. Then, solution A was added to solution B, gently homogenized, and incubated at room temperature for 30 to 45 min. After washing, cells were transfected in 200 μ l of SFM with 50 μ l of the transfecting mix, and incubated 6h at 37°C, 5% CO₂. Then, 250 μ l of fresh SFM were added and cells were incubated 18-24h at 37°C, 5% CO₂. Cells were washed again, added with 500 μ l of fresh SFM, and incubated for 24h at 37°C, 5% CO₂. Then, cells were treated or not as described previously with IL-13 or rosiglitazone.

Nuclear protein extraction

About 6×10^6 adherent monocytes were cultured in 6-well plastic culture plates. After treatment with human IL-13 (20 ng/ml), 15d-PGJ₂ (1 μ M) and rosiglitazone (5 μ M) for 1 h, nuclear protein was isolated for the electrophoretic mobility shift assay (EMSA) and the DNA-binding activity. For the EMSA, protein extraction was performed using a standard method, and for the DNA-binding activity, protein extraction was performed using a lysis buffer included in the TransAM[®] kit (Active Motif, Rixensart, Belgium). We used the Bradford method for measuring protein concentration.

Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Double-stranded PPAR gel shift consensus oligonucleotides were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA): 5'-CAAAACTAGGTCAAAGGTCA-3'. Underlined letters correspond to the consensus PPRE half-site sequences. Oligonucleotides were radioactively end-labeled with [³²P]ATP (Perkin-Elmer Life Science, Paris, France) using T4 polynucleotide kinase (Promega, Charbonnières les Bains, France) and purified from unincorporated nucleotides by the QIAquick Nucleotides Removal Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Cells were cultured as above and were stimulated with IL-13 (20 ng/ml), 15d-PGJ₂ (1 μ M) and rosiglitazone (5 μ M) for 1 h. Nuclear protein extraction and assay were done as above.

About 15,000 cpm of oligonucleotide probe and 5 μ g of the various nuclear extracts were subjected to 5% PAGE. The gel was then dried and autoradiographed.

DNA-binding activity

A TransAM[®] kit (Active Motif, Rixensart, Belgium) was used to evaluate the DNA-binding activity of PPAR γ . Nuclear protein was extracted according to the manufacturer's procedure. 10 μ g of total extract were incubated in 96-well plastic culture plates coated with a PPRE. The detection of linked PPAR γ was carried out with a specific antibody and a secondary antibody coupled to HRP (horse radish peroxidase) supplied in the kit. After incubation with the substrate at the indicated time, the fluorescence was read at 450 nm using a Wallac 1420 Victor fluorimeter (Wallac, Turku, Finland).

All the data shown represent the amount of activated PPAR γ in arbitrary units.

Statistical analysis

The data are expressed as mean \pm S.E. of three separate experiments. For each experiment, the data were subjected to one-way analysis of variance followed by the means multiple comparisons method of Tukey. $p < 0,05$ was considered as the level of statistical significance.

RESULTS

*IL-13 and PPAR- γ ligands up-regulate anti-infectious functions of human monocytes against *Candida albicans*, and GW9662 reverses it*

We previously showed *in vitro* and *in vivo* on murine peritoneal macrophages that IL-13 and PPAR- γ ligands up-regulate, *via* a PPAR- γ pathway, fungicidal activities against *Candida albicans* such as phagocytosis and reactive oxygen species (ROS) release [5] (Coste & Lagane, 2007).

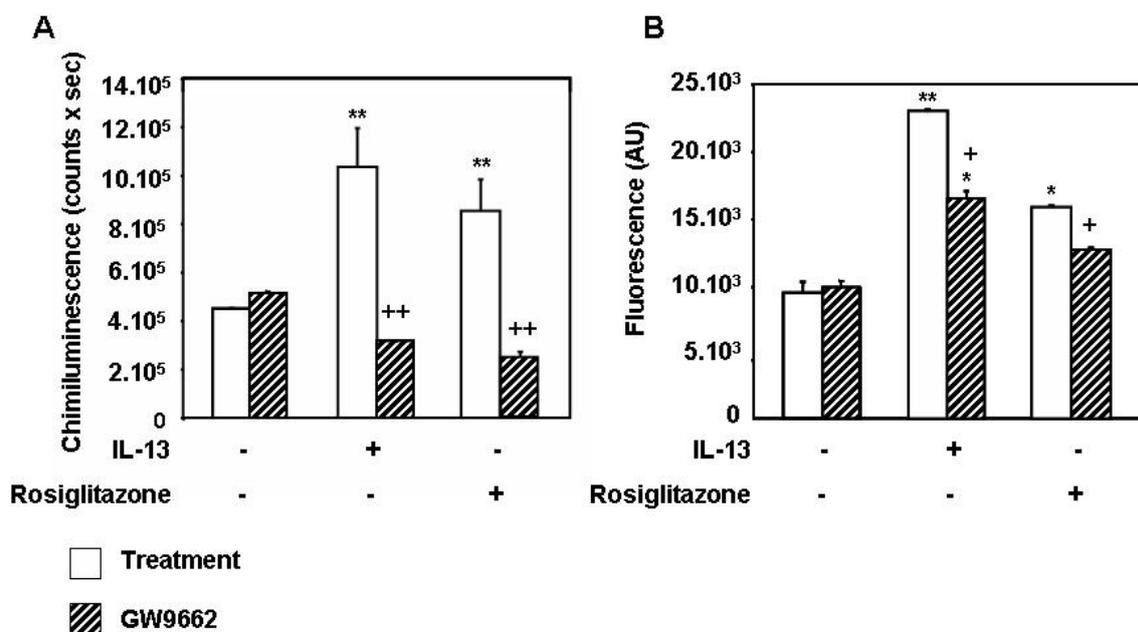


Figure 1: IL-13 and rosiglitazone potentiates human monocytes anti-infectious functions, reversed by GW9662. After adhesion, monocytes were cultured in SFM for 18-24 h with 20 ng/ml of IL-13, or 5 μ M of rosiglitazone in the presence or absence of 1 μ M of GW9662. Reactive oxygen species secretion was analysed with luminol by chemiluminescence in presence of *Candida albicans* (3:1) (A). Yeasts phagocytosis was determined by fluorimetry after one hour of challenge with *Candida albicans* stained with FITC (3:1) (B). Values are means \pm SE of three separate experiments. **, $p < 0.01$, and *, $p < 0.05$, indicate a significant difference compared with the control (untreated monocytes). ++ $p < 0.01$ and + $p < 0.05$ indicate a significant difference compared with respective treatment without GW9662.

Here we show by chemiluminescence assays that IL-13 and rosiglitazone, a synthetic ligand of PPAR- γ , increase human monocytes ROS secretion in response to *Candida albicans* (Fig. 1A). The GW9662, a specific and irreversible PPAR- γ antagonist, significantly inhibits this increase of ROS secretion induced by IL-13 and rosiglitazone in presence of yeasts. These results suggest that, as in murine peritoneal macrophages, PPAR- γ is involved in the increase of ROS secretion by IL-13 and rosiglitazone in human monocytes.

We also demonstrate in this study, using fluorescence assays challenging human monocytes with FITC labelled yeasts, that these cells treated with IL-13 or rosiglitazone have increased phagocytic capacities (Fig. 1B). The use of GW9662 reveals that PPAR- γ is also involved in *Candida albicans* phagocytosis enhanced by IL-13 or rosiglitazone.

Taken together, these results show that, as murine peritoneal macrophages, human monocytes possess up-regulated anti-infectious functions in response to IL-13 or rosiglitazone *via* a PPAR- γ signalling pathway.

IL-13 and PPAR- γ ligands have different effects on mannose receptor expression in human monocytes

We previously shown on murine peritoneal macrophages, using MR antisense, that anti-infectious functions such as phagocytosis and reactive oxygen species secretion were linked to mannose receptor expression, a key PRR involved in *Candida albicans* recognition and clearance [5]. Since we have demonstrated here that these effective functions were enhanced in human monocytes by IL-13 and rosiglitazone, we studied by flow cytometry MR expression on human monocytes in response to these treatments.

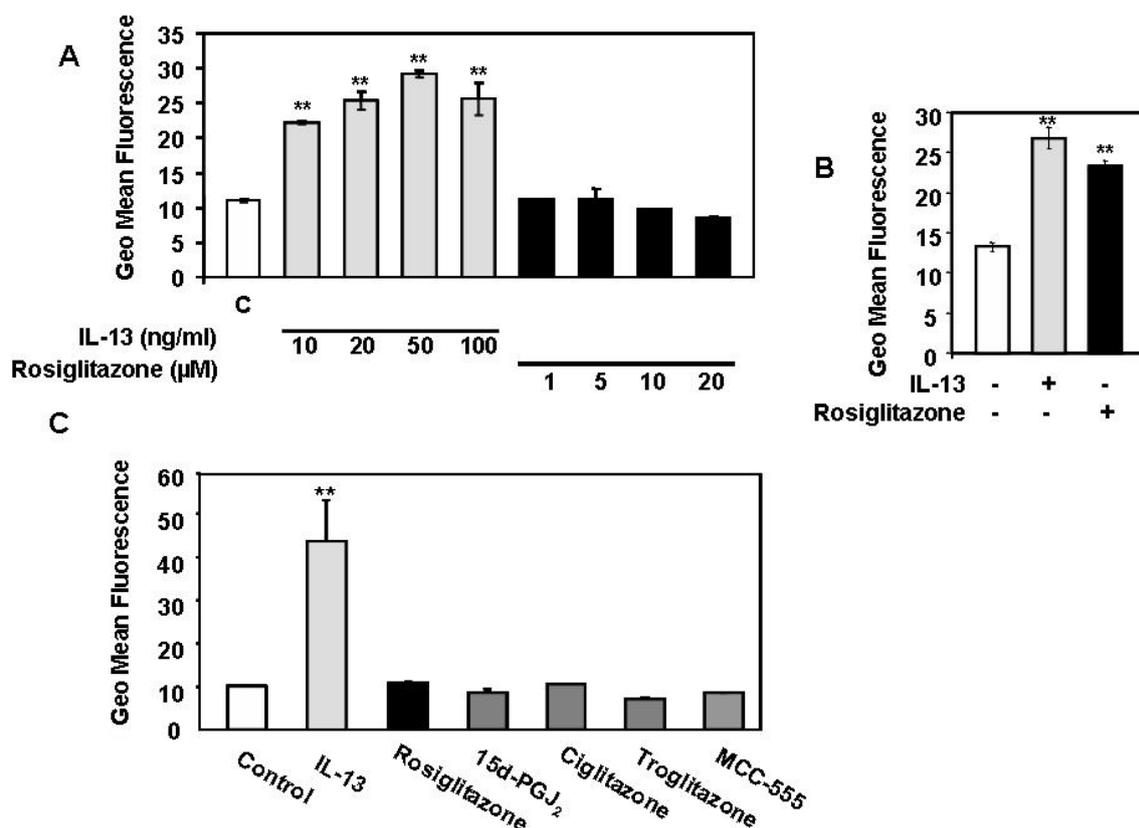


Figure 2: IL-13 but not PPAR- γ ligands up-regulates human monocytes MR expression. After adhesion, monocytes were cultured in SFM for 18-24 h in the presence of the following activators as indicated : 10, 20, 50, 100 ng/ml of IL-13 or 1, 5, 10, 20 μ M of rosiglitazone (A), or 20 ng/ml of IL-13 or 5 μ M of rosiglitazone, 15d-PGJ₂, ciglitazone, troglitazone, and MCC-555 (C). Cells were stained with an anti-CD206-PE antibody and After adhesion, cells were cultured in SFM for 18-24 h with 20 ng/ml of IL-13 or 5 μ M of rosiglitazone and stained with an anti-CD36-PE antibody (B). MR and CD36 expressions were analyzed by flow cytometry. Values are means \pm SE of three separate experiments. **, $p < 0.01$, indicates a significant difference compared with the control (untreated monocytes).

Surprisingly, flow cytometry shows at the surface of human monocytes, a significative and dose-dependant enhancement of MR expression by IL-13, but not by rosiglitazone (Fig. 2A). These effects of IL-13 were maximal at 50 ng/ml whereas increased amounts of rosiglitazone have no effects on MR expression (Fig. 2A).

In order to test effects of rosiglitazone on human monocytes, we measured its effects on CD36, a scavenger receptor class B involved in phagocytosis of erythrocytes parasitized with *Plasmodium falciparum*, and that can be induced by IL-13 *via* PPAR- γ . Indeed, we previously showed that both IL-

13 and rosiglitazone increased CD36 expression in human monocytes [29]. Fig. 2B reproduced these results demonstrating that the absence of effects of rosiglitazone is well specific to MR expression in human monocytes.

As rosiglitazone is a synthetic PPAR- γ ligand, we tested other ligands such as the natural agonist 15-deoxy- Δ^{12-14} prostaglandin J₂ (15d-PGJ₂), thiazolidinediones such as ciglitazone or troglitazone, and a new PPAR- γ agonist named MCC-555. Interestingly, none of these PPAR- γ ligands have effects on MR expression at human monocytes cell surface (Fig. 2C).

Taken together, these results raise the possibility that MR up-regulation mechanisms in human monocytes could be different than those in murine macrophages, and different from those of CD36 in human monocytes too.

AG490, an inhibitor of Jak-2, does not inhibit MR up-regulation by IL-13

As IL-13 is known to induce Stat-6 activation, we first studied mechanisms of MR overexpression by IL-13 using AG490. AG490 is a selective inhibitor of JAK-2, a tyrosine kinase that couples with Stat-6 to induce gene activation upon IL-13 treatment. Results of flow cytometry show that AG490 does not inhibit up-regulation of MR expression by IL-13 (Fig. 3), demonstrating that Stat-6 / Jak-2 does not participate to MR up-regulation by IL-13. These results suggest that another pathway may be involved in this raise of receptor expression.

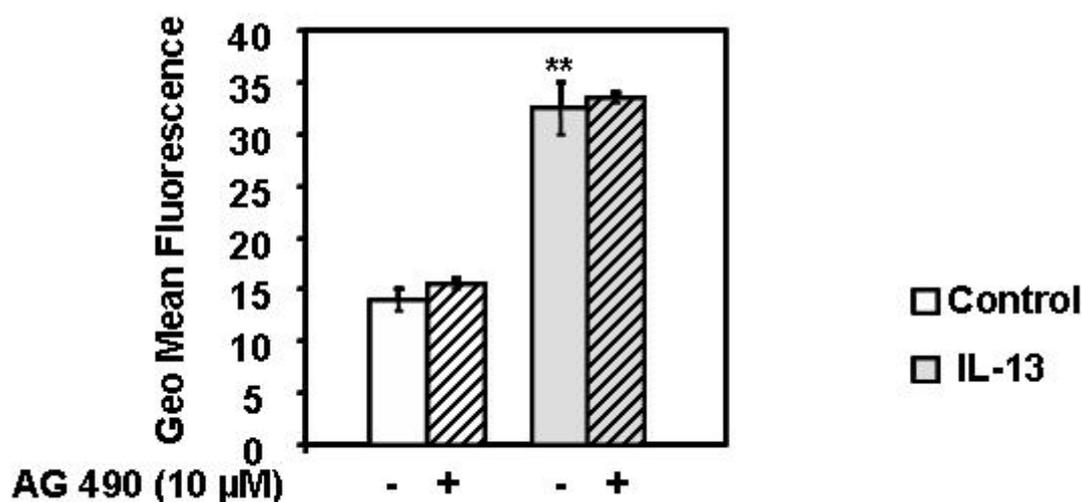


Figure 3: AG 490, an inhibitor of Jak-2, does not reverse MR up-regulation by IL-13. After adhesion, monocytes were cultured in SFM for 18-24 h with 20 ng/ml of IL-13 in the presence or absence of 10 μ M of AG 490. Cells were stained with an anti-CD206-PE antibody and MR expression was analyzed by flow cytometry. Values are means \pm SE of three separate experiments. **, $p < 0.01$ indicates a significant difference compared with the control (untreated monocytes).

GW9662 and T0070907, two antagonists of PPAR- γ , inhibit MR up-regulation by IL-13

We have previously shown that IL-13 up-regulates MR expression on peritoneal macrophages *via* PPAR- γ activation [5] (Coste and Lagane, 2007), and that IL-13 up-regulates CD36 *via* PPAR- γ activation on human monocytes. As we showed here that IL-13 is involved in up-regulation of human

monocytes MR expression independently of Stat-6 pathway, we tested GW9662 and T0070907, two selective antagonists of PPAR- γ , on MR expression.

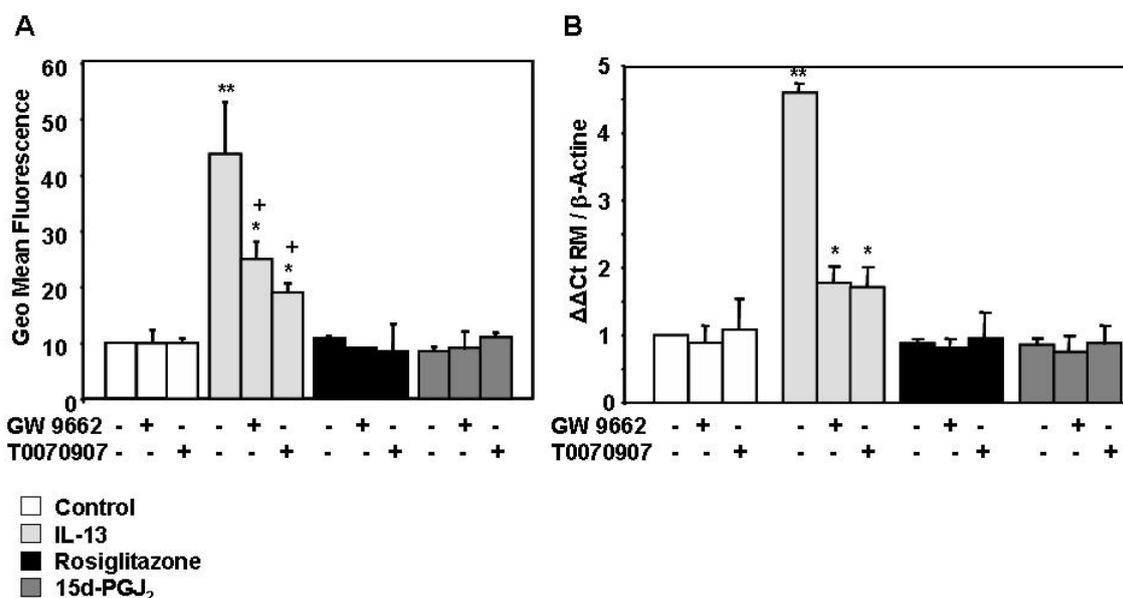


Figure 4: GW9662 and T0070907 partly reverse MR up-regulation by IL-13. After adhesion, monocytes were cultured in SFM for 18-24 h with 20 ng/ml of IL-13, or 5 μ M of rosiglitazone or 15d-PGJ₂ in the presence or absence of 1 μ M of GW9662 or of T0070907. Cells were stained with an anti-CD206-PE antibody and MR expression was analyzed by flow cytometry (A), or RNA extraction was performed to analyse MR mRNA expression by quantitative real-time RT-PCR. To examine the linearity of the assay, a serial dilution of the positive control sample was used. The linearity of the mRNA concentrations versus Ct values of the PCR reaction in the serial diluted samples was calculated by linear regression analysis. The N-fold differential expression of MR mRNA samples compared to the control β -actine was expressed as $2^{\Delta\Delta Ct}$. The effects of treatments were considered significant when the confidence interval of the data did not include the reference value 100. Values are means \pm SE of three separate experiments. **, $p < 0.01$, and *, $p < 0.05$, indicate a significant difference compared with the control (untreated monocytes). + $p < 0.05$ indicates a significant difference compared with respective treatment without GW9662 or T0070907.

Flow cytometry (Fig. 4A) reveals that both GW9662 and T0070907 inhibit significantly MR up-regulation by IL-13. On the other hand, specific PPAR- γ inhibitors have no effects on synthetic or natural PPAR- γ ligands stimulation (Fig. 4A). These results are confirmed by RT-PCR analysis which demonstrates that PPAR- γ antagonists can inhibit MR mRNA synthesis enhanced by IL-13 (Fig. 4B). These results suggest that PPAR- γ could regulate human MR expression enhanced by IL-13, and underlie the differences of action of PPAR- γ ligands and IL-13 in human monocytes. That's why we used another strategy to test in which way PPAR- γ could be involved in IL-13 signalling leading to MR up-regulation.

Human monocytes transfection with PPAR- γ selective siRNA reverses MR up-regulation by IL-13

To reinforce our hypothesis of the involvement of the nuclear receptor PPAR- γ in MR up-regulation by IL-13, we invalidate PPAR- γ in human monocytes by transfecting these cells with specific siRNA against PPAR- γ .

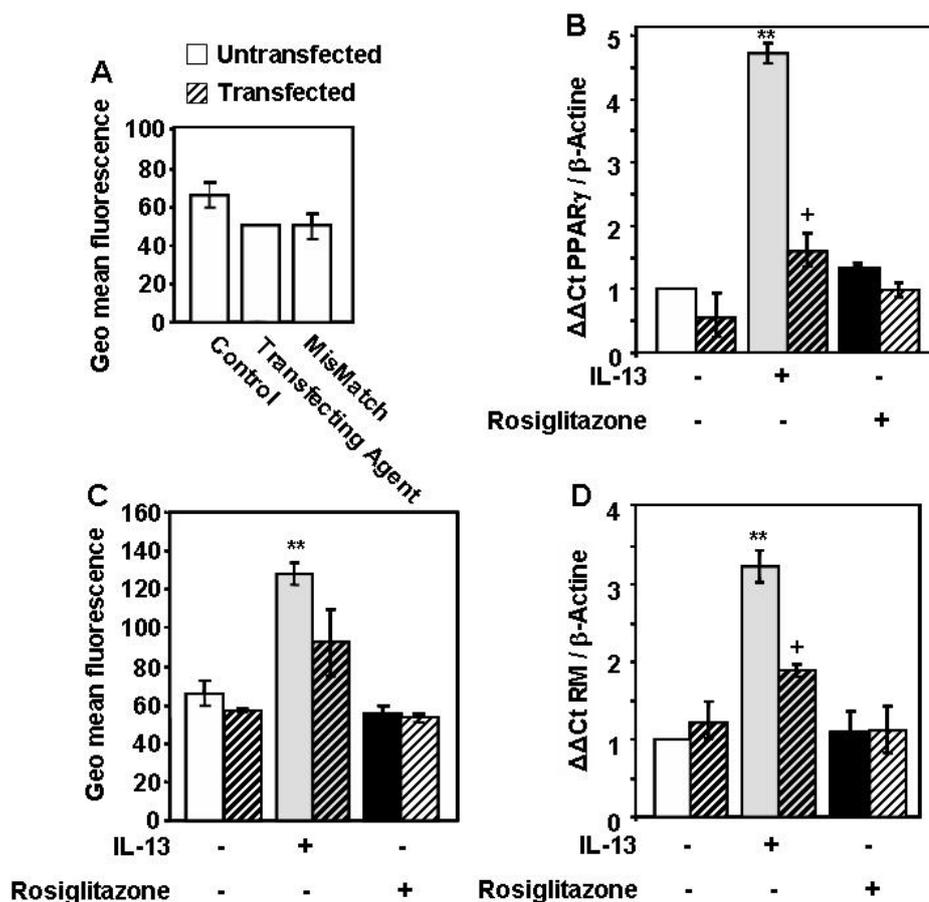


Figure 5: Human monocytes transfection with PPAR- γ selective siRNA partly reverses MR up-regulation by IL-13. After adhesion, human monocytes were transfected with PPAR- γ or mismatch siRNAs or with transfecting reagent only. After 24 h of incubation, cells were stimulated with 20 ng/ml of IL-13 or 5 μ M of rosiglitazone. Cells were stained with an anti-CD206-PE antibody and MR expression was analyzed by flow cytometry (A), or RNA extraction was performed to analyse RM (B) or PPAR- γ (C) RNAm expression by quantitative real-time RT-PCR. To examine the linearity of the assay, a serial dilution of the positive control sample was used. The linearity of the mRNA concentrations versus Ct values of the PCR reaction in the serial diluted samples was calculated by linear regression analysis. The N-fold differential expression of MR or PPAR- γ mRNA samples compared to the control β -actine was expressed as $2^{\Delta\Delta Ct}$. The effects of treatments were considered significant when the confidence interval of the data did not include the reference value 100. Values are means \pm SE of three separate experiments. **, $p < 0.01$, indicates a significant difference compared with the control (untreated monocytes). + $p < 0.05$ indicates a significant difference compared with respective treatment without siRNA transfection.

Transfecting agent used and control mismatch siRNA have no significant effects on MR expression as shown by flow cytometry (Fig. 5A).

RT-PCR experiments demonstrate that IL-13 but not rosiglitazone up-regulates PPAR- γ mRNA expression in human monocytes (Fig. 5B). Moreover, PPAR- γ mRNA expression is significantly impaired in transfected human monocytes (Fig. 5B), which demonstrates on one hand that cells are correctly transfected, and on the other hand that PPAR- γ specific siRNA involves degradation of PPAR- γ mRNA.

Flow cytometry and RT-PCR also demonstrate that MR protein and mRNA expressions are impaired in human monocytes transfected with PPAR- γ siRNA compared to untransfected ones (Fig. 5C and

5D). These results reinforce those obtained with specific PPAR- γ antagonists, and strongly suggest that PPAR- γ should be involved in MR up-regulation by IL-13.

IL-13 induces PPAR- γ activation in human monocytes

As the previous experiment strongly suggested that IL-13 activates PPAR γ , we studied the role of IL-13 on PPAR γ DNA binding activity in nuclear protein extracts of monocytes after treatment by 15d-PGJ₂, rosiglitazone or IL-13 (Fig. 6A). A TransAM[®] method using a specific PPAR- γ antibody confirmed the EMSA results and demonstrated that PPAR- γ treatment by IL-13 (Fig. 6B).

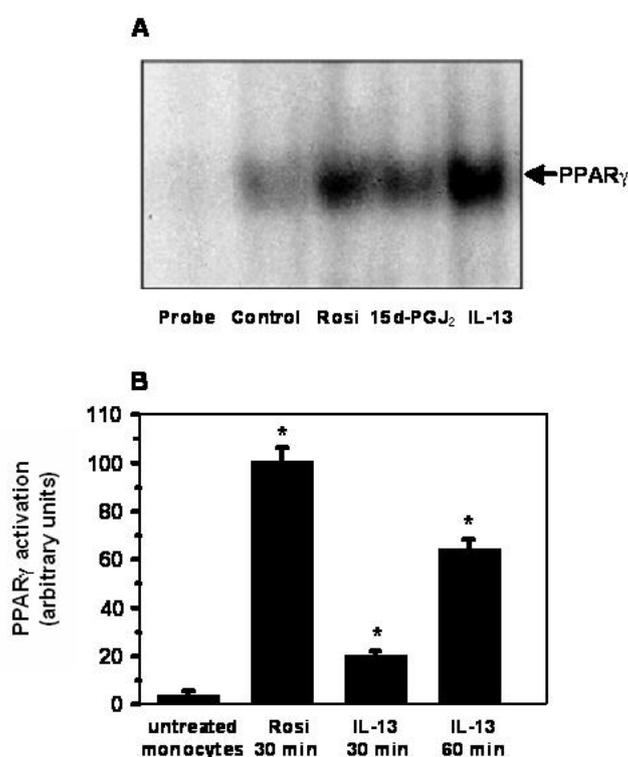


Figure 6: IL-13 induces PPAR γ activation in human monocytes. Activation of PPAR γ was determined by EMSA (A) and by ELISA with TransAM[®] technology (B). (A) Cells were untreated (control) or treated by rosiglitazone (Rosi) (5 μ M) or IL-13 (50 ng/ml) or 15d-PGJ₂ (1 μ M) for 1 h. Nuclear extracts were collected and EMSA realized as described in Materials and Methods. Experiment was repeated two times with similar results. (B) Human monocytes were untreated or exposed to rosiglitazone (Rosi) (5 μ M for 1h) or IL-13 (50 ng/ml for 30 min or 1 h). 10 μ g of nuclear proteins were used to realized an immunodetection of activated PPAR γ using a TransAM[®] kit. The data are expressed as relative arbitrary unit with rosiglitazone treatment set at 100. The results are representative of three different experiments. Values are means \pm SE of three separate experiments. *, $p < 0.01$, indicates a significant difference compared with the control (untreated monocytes).

DISCUSSION

Candida albicans is part of the microbial flora that colonizes the mucocutaneous surfaces of the oral cavity and gastrointestinal tract of many mammals as well as other organisms [1]. This yeast represents a serious issue in immunocompromised patients and those undergoing immunosuppressive therapies, particularly with impaired phagocytic cell function (mainly neutrophils, monocytes and macrophages). We previously showed that murine macrophages have increased fungicidal activities against *Candida albicans* such as phagocytosis and reactive oxygen species release upon treatments with IL-13 or rosiglitazone [5]. In this study, we show that, as in murine macrophages, IL-13 and PPAR- γ ligands promote increase of reactive oxygen species secretion and uptake of *Candida albicans* by human monocytes. As in murine macrophages, we demonstrate with GW9662, a specific and irreversible antagonist of PPAR- γ , that this raise of anti-infectious functions against *Candida albicans* involves activation of this transcription factor.

We previously shown on murine peritoneal macrophages, using mannose receptor antisense, that these anti-infectious functions are coupled with mannose receptor, a key PRR involved in recognition and clearance of pathogenic agents carrying mannose motives at their cell surface, such as *Candida albicans*. Here, we demonstrate that only IL-13, and not PPAR- γ ligands, is able to induce MR expression on human monocytes *via* PPAR- γ . As we previously shown that IL-13 and PPAR- γ ligands are both able to induce CD36 [29], a scavenger receptor involved in phagocytosis of erythrocytes parasited with *Plasmodium falciparum*, our results suggest that MR and CD36 may not be regulated by the same way in human monocytes. In the same previous work we have demonstrated, using GW 9662, a specific and irreversible inhibitor of PPAR- γ , that CD36 induction by IL-13 and rosiglitazone involved the nuclear receptor PPAR- γ [29]. As CD36 and MR seem to be differently regulated in human monocytes, and as PPAR- γ ligands have no effect on MR expression, we studied if another transcription factor, as Stat-6, should be involved in MR overexpression by IL-13.

Indeed, with AG490, a selective inhibitor of JAK-2, a tyrosine kinase that couples with Stat-6 to induce gene activation upon IL-13 treatment, we demonstrate that Stat-6 / JAK-2 are not involved in overexpression of MR by IL-13.

We previously showed on murine peritoneal macrophages that IL-13 promotes MR overexpression *via* PPAR- γ activation [5]. The use of GW9662 and T0070907, two specific and irreversible inhibitors of PPAR- γ inhibits MR expression enhanced by IL-13, and those at the levels of the protein and mRNA, suggesting the involvement of this nuclear receptor in MR regulation by IL-13. To reinforce these results, we used a second strategy to demonstrate the role of PPAR- γ , based on the transfection of human monocytes with PPAR- γ specific siRNA. Results of this experiment strongly suggest the involvement of PPAR- γ in induction of MR expression by IL-13 as siRNA reverses MR protein and mRNA expressions enhanced by IL-13.

In IL-13 treated human monocytes, we demonstrate by RT-PCR that PPAR- γ mRNA is four fold increased. The great disponibility of the transcription factor in these cells may explain the difference of responsiveness with rosiglitazone. To assess the possibility that IL-13 can activate PPAR- γ in human monocytes, we performed an EMSA on nuclear extracts from cells treated with IL-13 or PPAR- γ

ligands. Results obtained confirm that not only PPAR- γ ligands but also IL-13 are able to activate PPAR- γ and to promote its binding to promoter regions containing a PPAR Responsive Element. These results, confirmed by TransAM[®], strongly suggest that PPAR- γ can be activated by IL-13 in human monocytes, reinforcing our hypothesis of the involvement of this nuclear receptor in induction of MR expression by IL-13.

The involvement of PPAR- γ in CD36 over-expression by IL-13 and rosiglitazone remains clear. Thus, it has been shown that IL-13 induces PPAR- γ activation *via* mobilization of a cytosolic PLA₂ and production from arachidonic acid metabolism of 15d-PGJ₂, a PPAR- γ natural ligand, which binds directly to this nuclear receptor promoting its activation, as the synthetic ligand rosiglitazone does [5, 29]. But the regulation of MR expression by IL-13 is not so well established. In order to explain differences of response between IL-13 and rosiglitazone on MR expression compared to CD36, we will develop CHromatin ImmunoPrecipitation (ChIP) assays in our laboratory to study the potent recruitment and fixation of PPAR- γ in the promoter regions of these genes. These experiments will allow us to confirm by RT-PCR that PPAR- γ activated by IL-13 or rosiglitazone can bind to CD36 promoter and to determine if it can bind to those of MR in human monocytes.

The difference of responsiveness of human monocytes to both IL-13 or rosiglitazone on MR expression suggests the possible involvement of other receptors in the enhancement of ROS secretion and phagocytosis of *Candida albicans*. Indeed, IL-13 induces several receptors which are able to internalize *Candida albicans* such as MR [5, 8], Dectin-1 [31], or CD209 [32, 33]. Among these multitude of possibilities, Dectin-1 seems to be a good candidate because this receptor triggers phagocytosis of microorganisms bearing β -glucan motives in their cell wall [34], such as *Candida albicans* [35], and can mediate ROS secretion by an intracytoplasmic tail and recruitment of tyrosine kinases [36]. First results obtained in our laboratory show that Dectin-1 expression is increased in response to IL-13 and PPAR- γ ligands in peritoneal murine macrophages. With the use of GW 9662 and PPAR- γ specific siRNA, we have shown that PPAR- γ is involved in this up-regulation of Dectin-1 by IL-13 and PPAR- γ ligands. Using laminarin from *Laminaria digitata*, an inhibitor of Dectin-1, we also shown that Dectin-1 is partly involved in phagocytosis and reactive oxygen species secretion of macrophages in response to *Candida albicans*. These preliminary results argue in favour of the involvement of Dectin-1 in *Candida albicans* elimination by macrophages, and ask the question of the possibility of its involvement in human monocytes anti-infectious functions. This hypothesis is actually under investigations in our laboratory, using laminarin and siRNA specific for this receptor in human monocytes.

REFERENCES

- 1 Dupont, P. F., *Candida albicans*, the opportunist. A cellular and molecular perspective. *J Am Podiatr Med Assoc* 1995. 85: 104-115.
- 2 Hume, D. A., Ross, I. L., Himes, S. R., Sasmono, R. T., Wells, C. A. and Ravasi, T., The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol* 2002. 72: 621-627.
- 3 Aderem, A. and Underhill, D. M., Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999. 17: 593-623.
- 4 Vazquez-Torres, A. and Balish, E., Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997. 61: 170-192.
- 5 Coste, A., Dubourdeau, M., Linas, M. D., Cassaing, S., Lepert, J. C., Balard, P., Chalmeton, S., Bernad, J., Orfila, C., Seguela, J. P. and Pipy, B., PPARgamma promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13. *Immunity* 2003. 19: 329-339.
- 6 Janeway, C. A., Jr., The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunity Today* 1992. 13: 11-16.
- 7 Stahl, P. D. and Ezekowitz, R. A., The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense. *Curr Opin Immunol* 1998. 10: 50-55.
- 8 Coste, A., Linas, M. D., Cassaing, S., Bernad, J., Chalmeton, S., Seguela, J. P. and Pipy, B., A sub-inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon-gamma- and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages. *J Antimicrob Chemother* 2002. 49: 731-740.
- 9 Stein, M., Keshav, S., Harris, N. and Gordon, S., Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 1992. 176: 287-292.
- 10 Doyle, A. G., Herbein, G., Montaner, L. J., Minty, A. J., Caput, D., Ferrara, P. and Gordon, S., Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma. *Eur J Immunol* 1994. 24: 1441-1445.
- 11 Martinez-Pomares, L., Reid, D. M., Brown, G. D., Taylor, P. R., Stillion, R. J., Linehan, S. A., Zamze, S., Gordon, S. and Wong, S. Y., Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies. *J Leukoc Biol* 2003. 73: 604-613.
- 12 Alan, R., Ezekowitz, B., Hill, M. and Gordon, S., Interferon alpha/beta selectively antagonises down-regulation of mannosyl-fucosyl receptors on activated macrophages by interferon gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 1986. 136: 737-744.
- 13 Pontow, S. E., Kery, V. and Stahl, P. D., Mannose receptor. *Int Rev Cytol* 1992. 137B: 221-244.
- 14 Clohisy, D. R., Bar-Shavit, Z., Chappel, J. C. and Teitelbaum, S. L., 1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates bone marrow macrophage precursor proliferation and differentiation. Up-regulation of the mannose receptor. *J Biol Chem* 1987. 262: 15922-15929.
- 15 Schreiber, S., Perkins, S. L., Teitelbaum, S. L., Chappel, J., Stahl, P. D. and Blum, J. S., Regulation of mouse bone marrow macrophage mannose receptor expression and activation by prostaglandin E and IFN-gamma. *J Immunol* 1993. 151: 4973-4981.
- 16 Schreiber, S., Blum, J. S., Chappel, J. C., Stenson, W. F., Stahl, P. D., Teitelbaum, S. L. and Perkins, S. L., Prostaglandin E specifically upregulates the expression of the mannose-receptor on mouse bone marrow-derived macrophages. *Cell Regul* 1990. 1: 403-413.
- 17 Harris, N., Super, M., Rits, M., Chang, G. and Ezekowitz, R. A., Characterization of the murine macrophage mannose receptor: demonstration that the downregulation of receptor expression mediated by interferon-gamma occurs at the level of transcription. *Blood* 1992. 80: 2363-2373.
- 18 Cabrero, A., Laguna, J. C. and Vazquez, M., Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2002. 1: 243-248.
- 19 Kliewer, S. A., Sundseth, S. S., Jones, S. A., Brown, P. J., Wisely, G. B., Koble, C. S., Devchand, P., Wahli, W., Willson, T. M., Lenhard, J. M. and Lehmann, J. M., Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997. 94: 4318-4323.
- 20 Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G., Chen, H. and Evans, R. M., Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell* 1998. 93: 229-240.
- 21 Tontonoz, P., Hu, E. and Spiegelman, B. M., Regulation of adipocyte gene expression and differentiation by peroxisome proliferator activated receptor gamma. *Curr Opin Genet Dev* 1995. 5: 571-576.

- 22 Lehmann, J. M., Moore, L. B., Smith-Oliver, T. A., Wilkison, W. O., Willson, T. M. and Kliewer, S. A., An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 1995. 270: 12953-12956.
- 23 Kliewer, S. A., Lenhard, J. M., Willson, T. M., Patel, I., Morris, D. C. and Lehmann, J. M., A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995. 83: 813-819.
- 24 Spiegelman, B. M., Peroxisome proliferator-activated receptor gamma: A key regulator of adipogenesis and systemic insulin sensitivity. *Eur J Med Res* 1997. 2: 457-464.
- 25 Sharma, A. M. and Staels, B., Review: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma and adipose tissue--understanding obesity-related changes in regulation of lipid and glucose metabolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007. 92: 386-395.
- 26 Ricote, M., Huang, J. T., Welch, J. S. and Glass, C. K., The peroxisome proliferator-activated receptor(PPARgamma) as a regulator of monocyte/macrophage function. *J Leukoc Biol* 1999. 66: 733-739.
- 27 von Knethen, A. and Brune, B., PPARgamma--an important regulator of monocyte/macrophage function. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2003. 51: 219-226.
- 28 Huang, J. T., Welch, J. S., Ricote, M., Binder, C. J., Willson, T. M., Kelly, C., Witztum, J. L., Funk, C. D., Conrad, D. and Glass, C. K., Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature* 1999. 400: 378-382.
- 29 Berry A. and Balard, P., Coste, A., Olagner, D., Lagane, C., Authier, H., Benoit-Vical, F., Lepert, J. C., Séguéla, J. P., Magnaval, J. F., Chambon, P., Metzger, D., Desvergne, B., Wahli, W., Auwerx, J. and Pipy, B., IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPAR-gamma activation. *Eur J Immunol* 2007. (in press).
- 30 Berry, A., Chene, G., Benoit-Vical, F., Lepert, J. C., Bernad, J., Marchou, B., Seguela, J. P., Magnaval, J. F. and Pipy, B., Ex vivo and in vitro impairment of CD36 expression and tumor necrosis factor-alpha production in human monocytes in response to Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes. *J Parasitol* 2005. 91: 316-322.
- 31 Willment, J. A., Lin, H. H., Reid, D. M., Taylor, P. R., Williams, D. L., Wong, S. Y., Gordon, S. and Brown, G. D., Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide. *J Immunol* 2003. 171: 4569-4573.
- 32 Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J. M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G. J., Netea, M. G., Kullberg, B. J., Romani, L. and Figdor, C. G., The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol* 2003. 33: 532-538.
- 33 Tailleux, L., Pham-Thi, N., Bergeron-Lafaurie, A., Herrmann, J. L., Charles, P., Schwartz, O., Scheinmann, P., Lagrange, P. H., de Blic, J., Tazi, A., Gicquel, B. and Neyrolles, O., DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis. *PLoS Med* 2005. 2: e381.
- 34 Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S. and Gordon, S., Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans. *J Exp Med* 2003. 197: 1119-1124.
- 35 Gantner, B. N., Simmons, R. M. and Underhill, D. M., Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *Embo J* 2005. 24: 1277-1286.
- 36 Underhill, D. M., Rossnagle, E., Lowell, C. A. and Simmons, R. M., Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood* 2005. 106: 2543-2550.

2.3. Conclusions et perspectives

Dans cette étude, nous avons montré que, comme pour les macrophages péritonéaux murins, le traitement des monocytes humains par l'IL-13 et les ligands de PPAR- γ potentialise les fonctions anti-infectieuses de ces cellules vis-à-vis de *Candida albicans*, à savoir la phagocytose et la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène. Comme nous le montrons avec le GW 9662, cette augmentation du pouvoir microbicide des monocytes, conduisant à l'élimination de l'agent pathogène *in vitro*, est dépendante de l'activation du facteur de transcription PPAR- γ .

L'étude de l'expression du récepteur mannose par les monocytes humains en réponse à l'IL-13 et à la rosiglitazone révèle que seule la cytokine est capable d'augmenter cette expression à la surface du monocyte humain. Ce résultat est en opposition avec nos travaux précédents qui montrent que les ligands de PPAR- γ sont capables de réguler positivement le récepteur mannose à la surface des macrophages murins. Ces résultats contradictoires suggèrent d'une part l'implication d'un autre récepteur dans le déclenchement des fonctions anti-infectieuses des monocytes humains par les ligands de PPAR- γ , et d'autre part des voies de signalisation différentes impliquées dans la régulation du récepteur mannose chez l'homme et la souris.

Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques et de siRNA, nous avons montré que l'IL-13 induit le récepteur mannose *via* PPAR- γ . Ces résultats sont renforcés par le fait que l'IL-13 est capable d'activer ce facteur de transcription. Cependant, ces résultats sont à prendre avec précaution dans la mesure où les ligands de PPAR- γ n'ont aucun effet et où il a été montré que IL-13 et rosiglitazone induisent de la même façon le récepteur CD36 *via* PPAR- γ dans le monocyte humain.

Ainsi, les perspectives de ce travail seront de deux ordres.

D'une part, il s'agira de déterminer quel autre récepteur pourrait être impliqué dans la potentialisation des fonctions anti-infectieuses par l'IL-13 et les ligands de PPAR- γ . Un bon candidat pourrait être le récepteur Dectin-1 car il est induit par l'IL-13 et la rosiglitazone dans le macrophage murin, et il est capable d'internaliser *Candida albicans* et de sécréter des intermédiaires réactifs de l'oxygène en réponse à ce pathogène. Nous répondrons à cette question en utilisant la laminarine, un inhibiteur de Dectin-1 issu de *Laminaria digitata*, ainsi que des siRNA dirigés spécifiquement contre Dectin-1 afin d'invalider ce récepteur.

La seconde perspective sera de confirmer si la régulation du récepteur mannose par l'IL-13 implique PPAR- γ et comment. En effet, les inhibiteurs pharmacologiques et le siRNA suggèrent l'implication de ce récepteur nucléaire, alors que l'absence d'effet de la rosiglitazone suggère le contraire. De même, une analyse bioinformatique a permis de mettre en évidence l'existence de deux PPRE putatifs au niveau des séquences promotrices du récepteur mannose humain. Pour démontrer l'implication possible de PPAR- γ , nous mettrons en place une technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) qui devrait nous permettre de voir si PPAR- γ est capable de se fixer sur les séquences régulatrices du promoteur du gène du récepteur mannose. Nous prendrons comme témoin le CD36 dont nous avons montré que la régulation par l'IL-13 et la rosiglitazone implique PPAR- γ .

CONCLUSION GENERALE & PERSPECTIVES

Les macrophages jouent un rôle clé dans le déclenchement et la régulation de la réponse immunitaire. À ce titre, ils constituent la première ligne de défense de l'organisme et interviennent dans l'élimination directe de pathogènes, mais aussi dans l'inflammation et l'orientation des cellules immunitaires telles que les lymphocytes T vers un profil Th1 ou Th2, contribuant ainsi à la régulation des défenses antimicrobiennes. Classiquement, l'activation des fonctions anti-infectieuses des macrophages est décrite comme un phénomène dépendant de médiateurs peptidiques produits par les lymphocytes Th1 et les natural killer, et en particulier de l'IFN- γ . Cette cytokine entraîne la différenciation des macrophages en macrophages de type 1 (M1), capables d'éliminer des agents pathogènes via la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène. Au contraire, les cytokines Th2 sont décrites pour participer à la désactivation des fonctions effectrices des macrophages. Cependant, des travaux récents montrent qu'une nouvelle forme d'activation des macrophages existe. Cette activation, dite alternative, est régulée par des cytokines Th2 et notamment par l'IL-4 et l'IL-13, et conduit à la différenciation des macrophages en macrophages de type 2 (M2). Ces M2, entre autres marqueurs, expriment fortement le récepteur mannose [110], et il a été montré récemment qu'ils pouvaient participer à l'élimination de pathogènes non-opsonisés tels que *Candida albicans* [115, 147].

Des travaux précédents menés au laboratoire ont montré *in vitro* que l'IL-13 induit l'expression du récepteur mannose à la surface des macrophages péritonéaux murins. Cette induction est corrélée à l'augmentation des fonctions anti-infectieuses des macrophages telles que la phagocytose et la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène, conduisant à l'élimination de *Candida albicans in vitro* [115]. Ces mêmes résultats ont été obtenus avec des prostaglandines, médiateurs lipidiques issus du métabolisme de l'acide arachidonique, participant au même titre que les cytokines à l'activation et à la différenciation des macrophages. Le modèle *in vitro* ainsi utilisé a permis d'établir que des ligands naturels (15d-PGJ₂) et des ligands synthétiques de PPAR- γ (thiazolidinediones) ont des effets similaires aux cytokines Th2 sur les propriétés anti-infectieuses des macrophages et sur l'élimination de *Candida albicans* non-opsonisé [115]. Dans ces travaux, l'implication de PPAR- γ dans l'expression du récepteur mannose et l'élimination de la levure par l'IL-13 et les ligands de PPAR- γ a été démontré. Ces résultats soulignent le rôle important des macrophages dans l'immunité anti-infectieuse et suggèrent l'intérêt d'étudier les effets des ligands de PPAR- γ et de l'IL-13 dans la résolution de candidoses, et notamment chez des patients immunodéficients qui développent des candidoses orales gravissimes et chez lesquels les traitements actuellement disponibles n'ont qu'une efficacité très limitée.

Dans la lignée de ces résultats, l'objectif de nos travaux a été de démontrer la pertinence de ce modèle *in vivo*. Pour cela, nous avons utilisé deux modèles différents : d'une part des souris immunocompétentes, et d'autre part des souris immunodéficientes RAG-2^{-/-}. Nous avons montré que le traitement de ces animaux avec l'IL-13 ou des ligands de PPAR- γ diminue significativement la colonisation du tractus gastro-intestinal par *Candida albicans*. L'absence de cellules T et B fonctionnelles dans les RAG-2^{-/-} nous a permis de mimer les candidoses orales rencontrées chez les patients VIH⁺. Nos résultats montrent que les animaux RAG-2^{-/-} sont plus susceptibles à une

colonisation du tractus digestif que les souris immunocompétentes, après une seule inoculation par voie orale de *Candida albicans*. Cela suggère que l'immunité médiée par les cellules T et B serait importante pour contrôler *in vivo* la propagation de la levure au niveau du tractus gastro-intestinal, chez la souris. Toutefois, l'absence de *Candida albicans* au niveau du foie et des reins suggère que la candidose induite par voie orale ne devient pas systémique, même en l'absence de cellules T et B fonctionnelles. Ceci suggère que chez les animaux RAG-2^{-/-}, d'autres cellules immunocompétentes comme les NK, les polynucléaires, ou les macrophages sont capables d'empêcher la dissémination des levures au niveau du tractus digestif. De plus, nos résultats montrent que les ligands de PPAR- γ et l'IL-13 peuvent activer cette immunité à médiation cellulaire pour favoriser la clairance de *Candida albicans*.

Dans ce travail, nous démontrons également que le traitement des deux types de souris par les ligands de PPAR- γ ou l'IL-13 augmentent l'expression du récepteur mannose à la surface des macrophages péritonéaux. Cette augmentation s'accompagne d'une stimulation des propriétés anti-infectieuses de ces macrophages vis-à-vis de *Candida albicans*, telles que la phagocytose et la synthèse d'intermédiaires réactifs de l'oxygène (IROs). Ces deux événements sont corrélés à la diminution significative de la colonisation gastro-intestinale par *Candida albicans*.

L'implication du récepteur mannose dans les processus de phagocytose a déjà été évoquée. En effet, il a été montré que le traitement *in vitro* de macrophages par l'IL-13 stimulait les capacités phagocytaires de ces derniers, en induisant l'expression du récepteur mannose à leur surface [387]. De plus, l'implication de ce récepteur dans le processus de phagocytose a aussi été démontrée *in vitro* au laboratoire après traitement des macrophages avec de la BSA mannosylée ou avec un ARNm antisens spécifique du récepteur mannose [115]. Dans notre étude *in vivo*, l'analyse de la droite de régression et le calcul des coefficients de corrélation (0,98 pour les souris immunocompétentes et 0,97 pour les RAG-2^{-/-}) entre les index de phagocytose et le niveau d'expression du récepteur mannose suggère que l'augmentation de la phagocytose de *Candida albicans* non-opsonisé par les macrophages des souris traitées avec l'IL-13 ou les ligands de PPAR- γ est corrélée à l'augmentation de l'expression de ce récepteur.

Outre la phagocytose, il a été montré que l'hyperactivité oxydative des macrophages jouait un rôle capital dans la défense de l'hôte contre les infections par *Candida albicans* [128]. Nous avons montré *in vivo* que les macrophages issus de souris traitées par les ligands de PPAR- γ ou par l'IL-13 produisent des quantités plus importantes d'IROs en présence du pathogène. Cette hyperactivité oxydative, déclenchée par *Candida albicans*, uniquement chez les macrophages issus des souris traitées par les ligands de PPAR- γ ou par l'IL-13, est associée à l'induction du récepteur mannose et à l'élimination de *Candida albicans*. Il a été montré précédemment au laboratoire que l'augmentation de la production d'IROs par les macrophages traités avec des ligands de PPAR- γ ou l'IL-13 pouvait être bloquée par l'ARNm antisens du récepteur mannose, indiquant bien un lien direct entre ce récepteur et la synthèse d'IROs déclenchée par *Candida albicans* [115]. L'implication du récepteur mannose dans la production d'agents oxydants par les macrophages mis au contact des levures a été aussi établie par d'autres études. Notamment, il a été démontré que l'engagement d'un microorganisme sur le récepteur mannose entraîne une voie de transduction du signal aboutissant à la sécrétion d'IROs

[388]. De plus, des ligands solubles du récepteur mannose déclenchent la production d'IROs favorisant la mort d'*Escherichia coli* [154].

Dans ce travail, nous avons aussi étudié l'implication du facteur de transcription PPAR- γ dans ces phénomènes grâce à deux stratégies différentes : l'utilisation du GW 9662, un antagoniste spécifique et irréversible de PPAR- γ , et l'utilisation d'animaux hétérozygotes PPAR- $\gamma^{+/-}$. Ces dernières sont utilisées en raison de la grande difficulté d'obtenir des souris homozygotes PPAR- $\gamma^{-/-}$, car la délétion totale de PPAR- γ est létale au cours des premiers stades embryonnaires. Par ces deux méthodes, nous avons montré que le récepteur nucléaire PPAR- γ est impliqué dans l'induction de l'expression du récepteur mannose des macrophages et dans les fonctions anti-infectieuses qui lui sont associées.

L'ensemble de ces résultats suggère l'intérêt d'utiliser l'IL-13 ou les ligands de PPAR- γ , déjà utilisés en thérapeutique humaine, dans l'élimination de candidoses digestives chez l'homme.

Ainsi, dans la deuxième partie de nos travaux, nous nous sommes attachés à étudier l'induction des fonctions anti-infectieuses et du récepteur mannose chez le monocyte humain de patient sain. Nous avons montré que, de la même façon que chez le macrophage péritonéal de souris, le traitement *in vitro* des monocytes humains par les ligands de PPAR- γ et l'IL-13 induit les fonctions anti-*Candida* de ces cellules, à savoir la phagocytose et la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène. Grâce à l'utilisation du GW 9662, nous avons mis en évidence l'implication du récepteur nucléaire PPAR- γ dans ces mécanismes d'élimination de *Candida albicans* par les monocytes humains.

En revanche, nous avons mis en évidence une différence de réponse entre l'IL-13 et les ligands de PPAR- γ au niveau de l'expression du récepteur mannose. En effet, le fait que seule l'IL-13 induise le récepteur mannose suggère que d'autres récepteurs que le récepteur mannose, induits à la fois par l'IL-13 et par la rosiglitazone, pourraient participer à l'élimination de *Candida albicans* par les macrophages. Cela suggère aussi que les voies de régulation du récepteur mannose sont différentes entre le macrophage murin et le monocyte humain.

Nous nous sommes donc attachés à étudier les mécanismes de régulation du récepteur mannose par l'IL-13. Grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de Stat-6 et de PPAR- γ , nous avons pu montrer que ce dernier semblait impliqué dans cette régulation par l'IL-13, malgré le fait que les ligands de PPAR- γ n'ont aucun effet sur l'expression de ce récepteur. L'utilisation de siRNA dirigés spécifiquement contre PPAR- γ suggère également fortement que l'IL-13 induit le récepteur mannose *via* PPAR- γ dans le monocyte humain. Notre hypothèse est aussi renforcée par le fait que nous avons montré par EMSA que l'IL-13 était capable d'activer PPAR- γ au même titre que la rosiglitazone dans le monocyte humain.

Cependant, ces données sont à prendre avec précaution dans la mesure où les ligands de PPAR- γ n'ont aucun effet sur l'expression du récepteur mannose et où nous avons récemment montré qu'un autre gène, le CD36, impliqué dans la phagocytose d'érythrocytes parasités par *Plasmodium falciparum*, était induit de la même façon par l'IL-13 et les ligands de PPAR- γ dans le macrophage péritonéal murin comme dans le monocyte humain [116].

Les perspectives de ces travaux sont de deux types.

Tout d'abord, nous nous attacherons à préciser le rôle du récepteur mannose dans l'induction des fonctions anti-infectieuses des macrophages et des monocytes humains par l'IL-13 et par la rosiglitazone. En effet, le fait que la rosiglitazone augmente la phagocytose et la synthèse d'IROs dans le monocyte humain sans avoir d'effet sur l'expression du récepteur mannose suggère l'implication d'autres récepteurs dans ces processus. D'autres récepteurs, induits par l'IL-13 et capables d'internaliser *Candida albicans*, tels que Dectin-1 [389] ou encore DC-SIGN [390, 391] pourraient constituer de bons candidats à étudier. En effet, ces récepteurs pourraient même intervenir dans la sécrétion d'espèces réactives de l'oxygène puisqu'ils sont couplés à la NADPHoxydase. Des résultats préliminaires obtenus au laboratoire montrent que l'IL-13 et la rosiglitazone augmentent l'expression de Dectin-1 *via* PPAR- γ . De plus, grâce à l'utilisation de laminarines issues de *Laminaria digitata*, qui sont des glucanes inhibiteurs de Dectin-1, nous avons pu montrer que ce récepteur était aussi impliqué dans la phagocytose et la sécrétion d'IROs des macrophages murins en réponse à *Candida albicans*. Ce résultat est renforcé par des travaux récents qui démontrent que Dectin-1 peut médier la synthèse d'IROs grâce à sa queue intracytoplasmique et aux recrutement de tyrosines kinases [164].

Nous nous attacherons donc à définir les rôles respectifs des récepteurs mannose et Dectin-1 tout d'abord chez la souris, puis chez le monocyte humain. Pour cela, nous utiliserons des animaux déficients conditionnels pour le récepteur mannose, construits selon un système de recombinaison homologue « Cre-LoxP ». Chez la lignée murine parentale, les exons 13, 14 et 15, codant pour le domaine 4 lectine C (CRD4) du récepteur mannose, principal domaine lectine impliqué dans la reconnaissance du mannose, seront encadrés par des séquences loxP « floxées » (Figure 21). Ces souris seront croisées avec des souris portant le gène de la recombinase CRE en aval du promoteur du lysosome, enzyme exprimée dans les phagocytes. Ce système permettra de contrôler l'invalidation du gène du MR spécifiquement dans les macrophages. Ainsi, nous observerons l'effet des traitements par les ligands de PPAR- γ ou l'IL-13 sur les fonctions anti-infectieuses des macrophages péritonéaux de ces animaux en mesurant *ex vivo* d'une part la phagocytose des levures par ces cellules, et d'autre part leur capacité à produire des IROs. Nous observerons aussi la colonisation du tractus gastro-intestinal par la levure comme cela a été décrit précédemment.

Nous étudierons aussi l'implication de Dectin-1 en utilisant des souris dont le gène de ce récepteur a été invalidé dans les macrophages par recombinaison homologue dans un système « Cre-LoxP » (IGBMC, Strasbourg). Chez la lignée murine générée, le gène codant pour le récepteur Dectine-1 sera spécifiquement invalidé au niveau des macrophages. Pour cela, les exons 4, 5, et 6 codant pour le seul domaine lectine C du récepteur seront encadrés par des séquences loxP « floxées ». Ces animaux seront croisés avec des souris Lys-CRE permettant de contrôler la mutation dans le but de n'invalider ce gène que dans les macrophages.

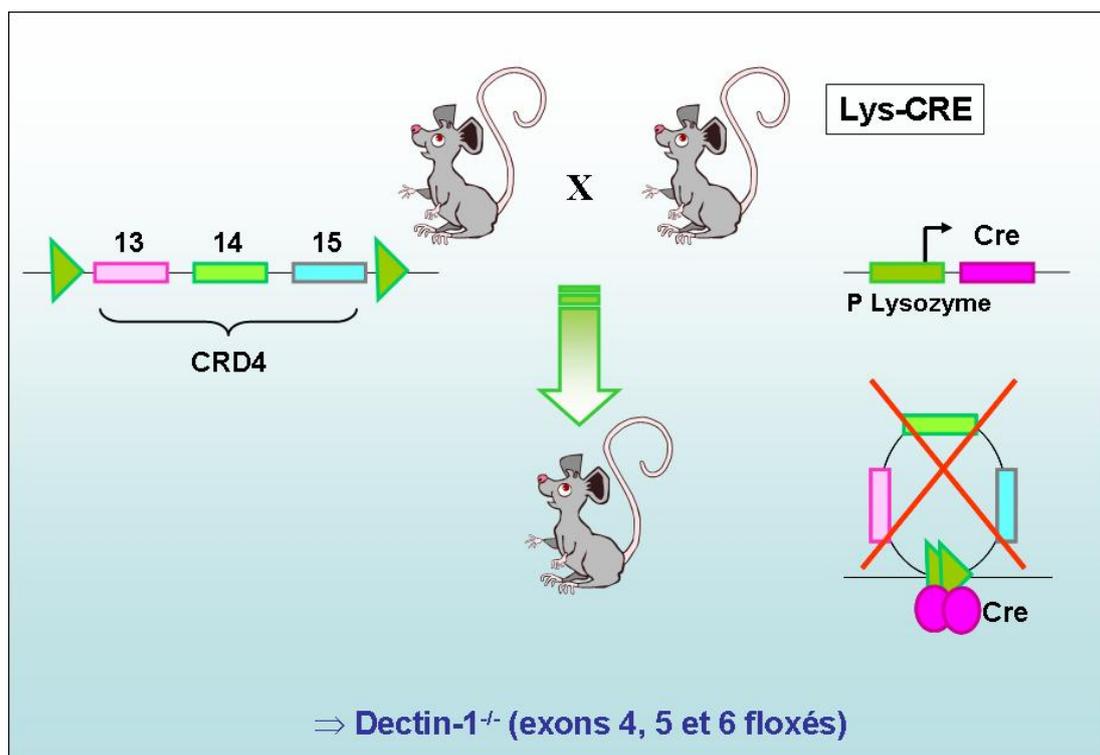


Figure 21 : Génération des souris *RM*^{-/-} par recombinaison homologue « Cre-LoxP »

Au niveau du monocyte humain, nous utiliserons des inhibiteurs du récepteur mannose (Mannanes) ou de Dectin-1 (Laminarines), ou des siRNA de chaque récepteur respectivement, afin de déterminer le rôle véritable de ces récepteurs dans la réponse anti-infectieuse des monocytes humains.

La deuxième perspective de ce travail consistera à expliquer les effets différents obtenus avec l'IL-13 et les ligands de PPAR- γ sur l'expression du récepteur mannose des monocytes humains. En effet, nous avons déjà montré que ces substances agissent de la même façon en induisant le récepteur CD36 [116]. D'une part l'expression du CD36 est régulé par PPAR- γ , et d'autre part l'expression du récepteur mannose induite par l'IL-13 semble PPAR- γ dépendante alors que les ligands de PPAR- γ n'ont aucun effet. Il faudra donc expliquer les différences de régulations observées entre ces deux récepteurs.

PPAR- γ appartient à la famille des récepteurs nucléaires dont l'activité est régulée par des ligands. Ces ligands peuvent être des acides gras naturels tels que des acides linoléïques, des dérivés d'acides gras tels que la prostaglandine J₂ ou encore des drogues antidiabétiques de la famille des thiazolidinediones. En présence de ces ligands, PPAR- γ forme un hétérodimère avec RXR afin d'activer la transcription de gènes cibles en se liant à un PPRE. La régulation de l'activité de PPAR- γ est le résultat de nombreux événements. Le premier niveau de cette régulation est la régulation de l'expression de PPAR- γ lui-même [392]. Par exemple, au cours de l'adipogénèse, différents facteurs de transcription transactivent le promoteur de PPAR- γ induisant ainsi sa transcription. Ainsi, les différences d'action mises en évidence entre la rosiglitazone et l'IL-13 pourraient s'expliquer par le fait

que, d'après nos résultats, seule l'IL-13 est capable d'induire l'expression des ARNm de PPAR- γ . Cependant, cette hypothèse semble discutable dans la mesure où nous avons aussi montré que l'IL-13 et la rosiglitazone étaient tous les deux capables d'induire l'expression du CD36 dans les monocytes humains, indépendamment du taux d'expression du facteur de transcription PPAR- γ [116]. Le second niveau impliqué dans la régulation de l'activité de PPAR- γ est la présence de facteurs contrôlant la transcription [392]. Ces facteurs, encore appelés co-activateurs ou co-répresseurs, interagissent avec PPAR- γ dans le but respectif d'activer ou de réprimer l'expression des gènes régulés par ce récepteur nucléaire. Dans certains cas, il a été montré que PPAR- γ pouvait se trouver dans un état non permissif à la transcription de gènes, malgré la présence de ligand [393]. Ainsi, des facteurs tels que les histones déacétylases (HDAC) pourraient empêcher l'activation de PPAR- γ par ses propres ligands. En effet, la déacétylation des histones est corrélée à un état transcriptionnellement silencieux de la chromatine. Bien que les mécanismes ne soient pas encore clairement élucidés, il a été montré que l'inhibition de ces HDAC par des inhibiteurs ou des siRNA rend PPAR- γ permissif à l'activation par ses ligands, et favorise ainsi la transcription de gènes tels que la E-cadhérine [393]. Dans cette étude, les auteurs montrent que PPAR- γ reste lié à HDAC3. Cette liaison lui permet toujours de se fixer sur les régions promotrices des gènes, mais HDAC3 maintient PPAR- γ dans un état transcriptionnel inactif. Ainsi, il existerait une nouvelles classe de gènes cibles pour PPAR- γ dont l'activation dépendrait de la présence d'inhibiteurs de co-répresseurs. Dans ce travail, notre hypothèse est que peut être il existe des différences de permissivité de PPAR- γ à ses ligands en raison de la fixation de protéines telles que HDAC, favorisant la répression de la transcription génique. La présence de ces facteurs entraînerait des modifications au niveau de la formation des complexes capables de se fixer aux régions promotrices du récepteur mannose. Pour cela, nous testerons des inhibiteurs des HDAC tels que l'acide valproïque, ou encore des siRNA spécifiques de ces déacétylases afin de déterminer leur rôle dans le défaut de réponse de PPAR- γ à la rosiglitazone. Nous vérifierons aussi par ChiP (CHromatin Immuno Precipitation) que PPAR- γ activé par la rosiglitazone ou par l'IL-13 est bien capable de se lier au niveau des séquences promotrices des gènes du récepteur mannose et du CD36 dans le monocyte humain. En effet, une étude bioinformatique nous a permis de mettre en évidence deux PPRE putatifs au niveau des régions promotrices du gène du récepteur mannose humain. Nous étudierons aussi la nature du complexe co-activateur / co-répresseur fixé sur PPAR- γ dans le cas du récepteur mannose en comparaison avec le CD36. Ainsi, nous devrions pouvoir expliquer les différences de réponse entre IL-13 et rosiglitazone d'une part, et macrophage murin et monocyte humain d'autre part.

En conclusion, s'il existe un doute sur le rôle de PPAR- γ dans l'induction du récepteur mannose des monocytes humains, nous avons clairement montré que l'IL-13 et les ligands de PPAR- γ (thiazolidinediones et prostaglandines) potentialisent les fonctions anti-infectieuses des monocytes / macrophages contre *Candida albicans*. Ces travaux suggèrent le rôle de PPAR- γ dans la défense immunitaire innée, et laissent entrevoir des perspectives de stratégies anti-infectieuses intéressantes, notamment dans le traitement de candidoses digestives chez le patient immunodéprimé.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- 1 Pfaller, M. A. and Diekema, D. J., **Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem.** *Clin Microbiol Rev* 2007. 20: 133-163.
- 2 Benedict, S. and Colagreco, J., **Fungal infections associated with malignancies, treatments, and AIDS.** *Cancer Nurs* 1994. 17: 411-417.
- 3 Pfaller, M. A., Jones, R. N., Doern, G. V., Sader, H. S., Messer, S. A., Houston, A., Coffman, S. and Hollis, R. J., **Bloodstream infections due to *Candida* species: SENTRY antimicrobial surveillance program in North America and Latin America, 1997-1998.** *Antimicrob Agents Chemother* 2000. 44: 747-751.
- 4 Chu, W. S., Magee, B. B. and Magee, P. T., **Construction of an Sfil macrorestriction map of the *Candida albicans* genome.** *J Bacteriol* 1993. 175: 6637-6651.
- 5 Graser, Y., Volovsek, M., Arrington, J., Schonian, G., Presber, W., Mitchell, T. G. and Vilgalys, R., **Molecular markers reveal that population structure of the human pathogen *Candida albicans* exhibits both clonality and recombination.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. 93: 12473-12477.
- 6 Buffo, J., Herman, M. A. and Soll, D. R., **A characterization of pH-regulated dimorphism in *Candida albicans*.** *Mycopathologia* 1984. 85: 21-30.
- 7 Sudbery, P. E., **The germ tubes of *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae show different patterns of septin ring localization.** *Mol Microbiol* 2001. 41: 19-31.
- 8 Sudbery, P., Gow, N. and Berman, J., **The distinct morphogenic states of *Candida albicans*.** *Trends Microbiol* 2004. 12: 317-324.
- 9 Barelle, C. J., Richard, M. L., Gaillardin, C., Gow, N. A. and Brown, A. J., ***Candida albicans* VAC8 is required for vacuolar inheritance and normal hyphal branching.** *Eukaryot Cell* 2006. 5: 359-367.
- 10 Gow, N. A., ***Candida albicans* switches mates.** *Mol Cell* 2002. 10: 217-218.
- 11 Cole, G. T., Seshan, K. R., Phaneuf, M. and Lynn, K. T., **Chlamyospore-like cells of *Candida albicans* in the gastrointestinal tract of infected, immunocompromised mice.** *Can J Microbiol* 1991. 37: 637-646.
- 12 Odds, J. C., ***Candida* and candidosis: 1988.**
- 13 Mavor, A. L., Thewes, S. and Hube, B., **Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes.** *Curr Drug Targets* 2005. 6: 863-874.
- 14 Poulain, D. and Feuillade-de-Chauvin, M., ***Candidoses et levures diverses: 1995.***
- 15 Cassone, A., **Cell wall of *Candida albicans*: its functions and its impact on the host.** *Curr Top Med Mycol* 1989. 3: 248-314.
- 16 Ruiz-Herrera, J., Elorza, M. V., Valentin, E. and Sentandreu, R., **Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity.** *FEMS Yeast Res* 2006. 6: 14-29.
- 17 Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Murgui, A. and Martinez, J. P., **Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004. 41: 187-196.
- 18 Surarit, R., Gopal, P. K. and Shepherd, M. G., **Evidence for a glycosidic linkage between chitin and glucan in the cell wall of *Candida albicans*.** *J Gen Microbiol* 1988. 134: 1723-1730.
- 19 Nakagawa, Y., Ohno, N. and Murai, T., **Suppression by *Candida albicans* beta-glucan of cytokine release from activated human monocytes and from T cells in the presence of monocytes.** *J Infect Dis* 2003. 187: 710-713.
- 20 Calderone, R. A. and Braun, P. C., **Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*.** *Microbiol Rev* 1991. 55: 1-20.
- 21 Shepherd, M. G., **Cell envelope of *Candida albicans*.** *Crit Rev Microbiol* 1987. 15: 7-25.
- 22 Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. and Martinez, J. P., **Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1998. 62: 130-180.
- 23 Jones, J. M., **Laboratory diagnosis of invasive candidiasis.** *Clin Microbiol Rev* 1990. 3: 32-45.
- 24 Ishibashi, K., Yoshida, M., Nakabayashi, I., Shinohara, H., Miura, N. N., Adachi, Y. and Ohno, N., **Role of anti-beta-glucan antibody in host defense against fungi.** *FEMS Immunol Med Microbiol* 2005. 44: 99-109.
- 25 Nelson, R. D., Shibata, N., Podzorski, R. P. and Herron, M. J., ***Candida* mannan: chemistry, suppression of cell-mediated immunity, and possible mechanisms of action.** *Clin Microbiol Rev* 1991. 4: 1-19.
- 26 Poulain, D., Fruit, J., Fournier, L., Dei Cas, E. and Vernes, A., **Diagnosis of systemic candidiasis: application of co-counterimmunoelectrophoresis.** *Eur J Clin Microbiol* 1986. 5: 427-434.

- 27 Tronchin, G., Poulain, D., Herbaut, J. and Biguet, J., **Localization of chitin in the cell wall of *Candida albicans* by means of wheat germ agglutinin. Fluorescence and ultrastructural studies.** *Eur J Cell Biol* 1981. 26: 121-128.
- 28 Molano, J., Bowers, B. and Cabib, E., **Distribution of chitin in the yeast cell wall. An ultrastructural and chemical study.** *J Cell Biol* 1980. 85: 199-212.
- 29 Mille, C., Janbon, G., Delplace, F., Ibata-Ombetta, S., Gaillardin, C., Strecker, G., Jouault, T., Trinel, P. A. and Poulain, D., **Inactivation of CaMIT1 inhibits *Candida albicans* phospholipomannan beta-mannosylation, reduces virulence, and alters cell wall protein beta-mannosylation.** *J Biol Chem* 2004. 279: 47952-47960.
- 30 Goyal, S. and Khuller, G. K., **Phospholipid composition and subcellular distribution in yeast and mycelial forms of *Candida albicans*.** *J Med Vet Mycol* 1992. 30: 355-362.
- 31 Mishra, P., Bolard, J. and Prasad, R., **Emerging role of lipids of *Candida albicans*, a pathogenic dimorphic yeast.** *Biochim Biophys Acta* 1992. 1127: 1-14.
- 32 Hoyer, L. L., Payne, T. L., Bell, M., Myers, A. M. and Scherer, S., ***Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family.** *Curr Genet* 1998. 33: 451-459.
- 33 Douglas, L. J., ***Candida* biofilms and their role in infection.** *Trends Microbiol* 2003. 11: 30-36.
- 34 Rotrosen, D., Edwards, J. E., Jr., Gibson, T. R., Moore, J. C., Cohen, A. H. and Green, I., **Adherence of *Candida* to cultured vascular endothelial cells: mechanisms of attachment and endothelial cell penetration.** *J Infect Dis* 1985. 152: 1264-1274.
- 35 Filler, S. G., Swerdloff, J. N., Hobbs, C. and Luckett, P. M., **Penetration and damage of endothelial cells by *Candida albicans*.** *Infect Immun* 1995. 63: 976-983.
- 36 Rotstein, D., Parodo, J., Taneja, R. and Marshall, J. C., **Phagocytosis of *Candida albicans* induces apoptosis of human neutrophils.** *Shock* 2000. 14: 278-283.
- 37 Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P. A., Poulain, D. and Jouault, T., **Role of phospholipomannan in *Candida albicans* escape from macrophages and induction of cell apoptosis through regulation of bad phosphorylation.** *Ann N Y Acad Sci* 2003. 1010: 573-576.
- 38 Ibata-Ombetta, S., Idziorek, T., Trinel, P. A., Poulain, D. and Jouault, T., ***Candida albicans* phospholipomannan promotes survival of phagocytosed yeasts through modulation of bad phosphorylation and macrophage apoptosis.** *J Biol Chem* 2003. 278: 13086-13093.
- 39 Schaller, M., Borelli, C., Korting, H. C. and Hube, B., **Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*.** *Mycoses* 2005. 48: 365-377.
- 40 Monod, M. and Borg-von Zepelin, M., **Secreted proteinases and other virulence mechanisms of *Candida albicans*.** *Chem Immunol* 2002. 81: 114-128.
- 41 Ghannoum, M. A., **Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis.** *Clin Microbiol Rev* 2000. 13: 122-143, table of contents.
- 42 Fu, Y., Ibrahim, A. S., Fonzi, W., Zhou, X., Ramos, C. F. and Ghannoum, M. A., **Cloning and characterization of a gene (LIP1) which encodes a lipase from the pathogenic yeast *Candida albicans*.** *Microbiology* 1997. 143 (Pt 2): 331-340.
- 43 Bodey, G. P., Mardani, M., Hanna, H. A., Boktour, M., Abbas, J., Girgawy, E., Hachem, R. Y., Kontoyiannis, D. P. and Raad, II, **The epidemiology of *Candida glabrata* and *Candida albicans* fungemia in immunocompromised patients with cancer.** *Am J Med* 2002. 112: 380-385.
- 44 Hage, C. A., Goldman, M. and Wheat, L. J., **Mucosal and invasive fungal infections in HIV/AIDS.** *Eur J Med Res* 2002. 7: 236-241.
- 45 Martino, R. and Subira, M., **Invasive fungal infections in hematology: new trends.** *Ann Hematol* 2002. 81: 233-243.
- 46 Samaranayake, L. P., Fidel, P. L., Naglik, J. R., Sweet, S. P., Teanpaisan, R., Coogan, M. M., Blignaut, E. and Wanzala, P., **Fungal infections associated with HIV infection.** *Oral Dis* 2002. 8 Suppl 2: 151-160.
- 47 LeBreton, G., *Classification des candidoses buccales.*
- 48 Munoz, P., Bouza, E., San Juan, R., Voss, A., Pascau, J. and Desco, M., **Clinical-epidemiological characteristics and outcome of patients with catheter-related bloodstream infections in Europe (ESGNI-006 Study).** *Clin Microbiol Infect* 2004. 10: 843-845.
- 49 Wisplinghoff, H., Bischoff, T., Tallent, S. M., Seifert, H., Wenzel, R. P. and Edmond, M. B., **Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study.** *Clin Infect Dis* 2004. 39: 309-317.
- 50 Cole, G. T., Halawa, A. A. and Anaissie, E. J., **The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside.** *Clin Infect Dis* 1996. 22 Suppl 2: S73-88.
- 51 Nucci, M., **Candiduria in hospitalized patients: a review.** *Braz J Infect Dis* 2000. 4: 168-172.

- 52 Andrutis, K. A., Riggle, P. J., Kumamoto, C. A. and Tzipori, S., **Intestinal lesions associated with disseminated candidiasis in an experimental animal model.** *J Clin Microbiol* 2000. 38: 2317-2323.
- 53 Castaldo, P., Stratta, R. J., Wood, R. P., Markin, R. S., Patil, K. D., Shaefer, M. S., Langnas, A. N., Reed, E. C., Li, S. J., Pillen, T. J. and et al., **Clinical spectrum of fungal infections after orthotopic liver transplantation.** *Arch Surg* 1991. 126: 149-156.
- 54 Kojic, E. M. and Darouiche, R. O., **Candida infections of medical devices.** *Clin Microbiol Rev* 2004. 17: 255-267.
- 55 Paya, C. V., **Prevention of fungal and hepatitis virus infections in liver transplantation.** *Clin Infect Dis* 2001. 33 Suppl 1: S47-52.
- 56 Redding, S. W., Zellars, R. C., Kirkpatrick, W. R., McAtee, R. K., Caceres, M. A., Fothergill, A. W., Lopez-Ribot, J. L., Bailey, C. W., Rinaldi, M. G. and Patterson, T. F., **Epidemiology of oropharyngeal Candida colonization and infection in patients receiving radiation for head and neck cancer.** *J Clin Microbiol* 1999. 37: 3896-3900.
- 57 Tumbarello, M., Tacconelli, E., de Gaetano Donati, K., Morace, G., Fadda, G. and Cauda, R., **Candidemia in HIV-infected subjects.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1999. 18: 478-483.
- 58 Ruhnke, M., Eigler, A., Tennagen, I., Geiseler, B., Engelmann, E. and Trautmann, M., **Emergence of fluconazole-resistant strains of *Candida albicans* in patients with recurrent oropharyngeal candidosis and human immunodeficiency virus infection.** *J Clin Microbiol* 1994. 32: 2092-2098.
- 59 Tacconelli, E., Tumbarello, M., Pittiruti, M., Leone, F., Lucia, M. B., Cauda, R. and Ortona, L., **Central venous catheter-related sepsis in a cohort of 366 hospitalised patients.** *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997. 16: 203-209.
- 60 Helfgott, A., Eriksen, N., Bundrick, C. M., Lorimor, R. and Van Eckhout, B., **Vaginal infections in human immunodeficiency virus-infected women.** *Am J Obstet Gynecol* 2000. 183: 347-355.
- 61 Carvalho, M., Guimaraes, C. M., Mayer, J. R. J., Bordignon, G. P. and Querioz-Telles, F., **Hospital-associated funguria: analysis of risk factors, clinical presentation and outcome.** *Braz J Infect Dis* 2001. 5: 313-318.
- 62 Krcmery, S., Dubrava, M. and Krcmery, V., Jr., **Fungal urinary tract infections in patients at risk.** *Int J Antimicrob Agents* 1999. 11: 289-291.
- 63 Stampler, E. F., Cruz, M. L., Mimouni, F., Rosenn, B., Siddiqi, T., Khoury, J. and Miodovnik, M., **High infectious morbidity in pregnant women with insulin-dependent diabetes: an understated complication.** *Am J Obstet Gynecol* 1990. 163: 1217-1221.
- 64 Revillard, J. P., **[Immunological aspects of corticotherapy].** *Ann Anesthesiol Fr* 1976. 17: 427-434.
- 65 Ostrosky-Zeichner, L., Marr, K. A., Rex, J. H. and Cohen, S. H., **Amphotericin B: time for a new "gold standard".** *Clin Infect Dis* 2003. 37: 415-425.
- 66 Campo, C., Anton, E., Morata, C. and Lacruz, J., **[Amphotericin B associated with severe liver toxicity].** *Rev Clin Esp* 1999. 199: 49.
- 67 Zager, R. A., **Polyene antibiotics: relative degrees of in vitro cytotoxicity and potential effects on tubule phospholipid and ceramide content.** *Am J Kidney Dis* 2000. 36: 238-249.
- 68 Adler-Moore, J., **AmBisome targeting to fungal infections.** *Bone Marrow Transplant* 1994. 14 Suppl 5: S3-7.
- 69 Allwinn, R., Schaumann, R. and Shah, P. M., **Influence of free or liposomal amphotericin B on killing of *Candida* species by human peritoneal macrophages.** *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 1995. 17: 163-167.
- 70 Sabra, R., Zeinoun, N., Sharaf, L. H., Ghali, R., Beshara, G. and Serhal, H., **Role of humoral mediators in, and influence of a liposomal formulation on, acute amphotericin B nephrotoxicity.** *Pharmacol Toxicol* 2001. 88: 168-175.
- 71 Khan, M. A. and Owais, M., **Toxicity, stability and pharmacokinetics of amphotericin B in immunomodulator tuftsin-bearing liposomes in a murine model.** *J Antimicrob Chemother* 2006. 58: 125-132.
- 72 Miyazaki, T., Miyazaki, Y., Izumikawa, K., Takeya, H., Miyakoshi, S., Bennett, J. E. and Kohno, S., **Fluconazole treatment is effective against a *Candida albicans* erg3/erg3 mutant in vivo despite in vitro resistance.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006. 50: 580-586.
- 73 Goldman, G. H., da Silva Ferreira, M. E., dos Reis Marques, E., Savoldi, M., Perlin, D., Park, S., Godoy Martinez, P. C., Goldman, M. H. and Colombo, A. L., **Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2004. 50: 25-32.

- 74 Hope, W. W., Warn, P. A., Sharp, A., Howard, S., Kasai, M., Louie, A., Walsh, T. J., Drusano, G. L. and Denning, D. W., **Derivation of an in vivo drug exposure breakpoint for flucytosine against *Candida albicans* and Impact of the MIC, growth rate, and resistance genotype on the antifungal effect.** *Antimicrob Agents Chemother* 2006. 50: 3680-3688.
- 75 Bassetti, M., Treccarichi, E. M., Righi, E., Sanguinetti, M., Bisio, F., Posteraro, B., Soro, O., Cauda, R., Viscoli, C. and Tumbarello, M., **Incidence, risk factors, and predictors of outcome of candidemia. Survey in 2 Italian university hospitals.** *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007. 58: 325-331.
- 76 Lortholary, O. and Dupont, B., **Antifungal prophylaxis during neutropenia and immunodeficiency.** *Clin Microbiol Rev* 1997. 10: 477-504.
- 77 Roilides, E., Dignani, M. C., Anaissie, E. J. and Rex, J. H., **The role of immunoreconstitution in the management of refractory opportunistic fungal infections.** *Med Mycol* 1998. 36 Suppl 1: 12-25.
- 78 Stevens, D. A., Walsh, T. J., Bistoni, F., Cenci, E., Clemons, K. V., Del Sero, G., Fed' Ostiani, C., Kullberg, B. J., Mencacci, A., Roilides, E. and Romani, L., **Cytokines and mycoses.** *Med Mycol* 1998. 36 Suppl 1: 174-182.
- 79 Mencacci, A., Cenci, E., Bacci, A., Bistoni, F. and Romani, L., **Host immune reactivity determines the efficacy of combination immunotherapy and antifungal chemotherapy in candidiasis.** *J Infect Dis* 2000. 181: 686-694.
- 80 Tascini, C., Vecchiarelli, A., Preziosi, R., Francisci, D., Bistoni, F. and Baldelli, F., **Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and fluconazole enhance anti-cryptococcal activity of monocytes from AIDS patients.** *Aids* 1999. 13: 49-55.
- 81 Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. and Ezekowitz, R. A., **Phylogenetic perspectives in innate immunity.** *Science* 1999. 284: 1313-1318.
- 82 Stahl, P. D. and Ezekowitz, R. A., **The mannose receptor is a pattern recognition receptor involved in host defense.** *Curr Opin Immunol* 1998. 10: 50-55.
- 83 Molero, G., Guillen, M. V., Martinez-Solano, L., Gil, C., Pla, J., Nombela, C., Sanchez-Perez, M. and Diez-Orejas, R., **The importance of the phagocytes' innate response in resolution of the infection induced by a low virulent *Candida albicans* mutant.** *Scand J Immunol* 2005. 62: 224-233.
- 84 Dongari-Bagtzoglou, A. and Fidel, P. L., Jr., **The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis.** *J Dent Res* 2005. 84: 966-977.
- 85 Matthews, R. and Burnie, J., **Antifungal antibodies: a new approach to the treatment of systemic candidiasis.** *Curr Opin Investig Drugs* 2001. 2: 472-476.
- 86 Casadevall, A., **Antibody immunity and invasive fungal infections.** *Infect Immun* 1995. 63: 4211-4218.
- 87 Johansen, F. E. and Brandtzaeg, P., **Transcriptional regulation of the mucosal IgA system.** *Trends Immunol* 2004. 25: 150-157.
- 88 Romani, L., **Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism.** *J Leukoc Biol* 2000. 68: 175-179.
- 89 Fidel, P. L., Jr., **Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis.** *Med Mycol* 2002. 40: 359-375.
- 90 Farah, C. S., Elahi, S., Drysdale, K., Pang, G., Gotjamanos, T., Seymour, G. J., Clancy, R. L. and Ashman, R. B., **Primary role for CD4(+) T lymphocytes in recovery from oropharyngeal candidiasis.** *Infect Immun* 2002. 70: 724-731.
- 91 Myers, T. A., Leigh, J. E., Arribas, A. R., Hager, S., Clark, R., Lilly, E. and Fidel, P. L., Jr., **Immunohistochemical evaluation of T cells in oral lesions from human immunodeficiency virus-positive persons with oropharyngeal candidiasis.** *Infect Immun* 2003. 71: 956-963.
- 92 Balish, E., Warner, T., Pierson, C. J., Bock, D. M. and Wagner, R. D., **Oropharyngeal candidiasis is lethal for transgenic mice with combined natural killer and T-cell defects.** *Med Mycol* 2001. 39: 261-268.
- 93 Banchereau, J. and Steinman, R. M., **Dendritic cells and the control of immunity.** *Nature* 1998. 392: 245-252.
- 94 Reis e Sousa, C., **Dendritic cells as sensors of infection.** *Immunity* 2001. 14: 495-498.
- 95 Pulendran, B., Palucka, K. and Banchereau, J., **Sensing pathogens and tuning immune responses.** *Science* 2001. 293: 253-256.
- 96 Romani, L., Bistoni, F. and Puccetti, P., **Fungi, dendritic cells and receptors: a host perspective of fungal virulence.** *Trends Microbiol* 2002. 10: 508-514.
- 97 de Jong, E. C., Vieira, P. L., Kalinski, P., Schuitemaker, J. H., Tanaka, Y., Wierenga, E. A., Yazdanbakhsh, M. and Kapsenberg, M. L., **Microbial compounds selectively induce Th1**

- cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J Immunol* 2002. 168: 1704-1709.
- 98 Weiner, H. L., Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol Rev* 2001. 182: 207-214.
- 99 Puccetti, P., Romani, L. and Bistoni, F., A TH1-TH2-like switch in candidiasis: new perspectives for therapy. *Trends Microbiol* 1995. 3: 237-240.
- 100 Newman, S. L. and Holly, A., *Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells. *Infect Immun* 2001. 69: 6813-6822.
- 101 Chen, B., Shi, Y., Smith, J. D., Choi, D., Geiger, J. D. and Mule, J. J., The role of tumor necrosis factor alpha in modulating the quantity of peripheral blood-derived, cytokine-driven human dendritic cells and its role in enhancing the quality of dendritic cell function in presenting soluble antigens to CD4+ T cells in vitro. *Blood* 1998. 91: 4652-4661.
- 102 Goxe, B., Latour, N., Bartholeyns, J., Romet-Lemonne, J. L. and Chokri, M., Monocyte-derived dendritic cells: development of a cellular processor for clinical applications. *Res Immunol* 1998. 149: 643-646.
- 103 Cohen, P. J. and Katz, S. I., Cultured human Langerhans cells process and present intact protein antigens. *J Invest Dermatol* 1992. 99: 331-336.
- 104 Betjes, M. G., Tuk, C. W., Struijk, D. G., Krediet, R. T., Arisz, L. and Beelen, R. H., Antigen-presenting capacity of macrophages and dendritic cells in the peritoneal cavity of patients treated with peritoneal dialysis. *Clin Exp Immunol* 1993. 94: 377-384.
- 105 d'Ostiani, C. F., Del Sero, G., Bacci, A., Montagnoli, C., Spreca, A., Mencacci, A., Ricciardi-Castagnoli, P. and Romani, L., Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J Exp Med* 2000. 191: 1661-1674.
- 106 Hume, D. A., Ross, I. L., Himes, S. R., Sasmono, R. T., Wells, C. A. and Ravasi, T., The mononuclear phagocyte system revisited. *J Leukoc Biol* 2002. 72: 621-627.
- 107 van Furth, R., Cohn, Z. A., Hirsch, J. G., Humphrey, J. H., Spector, W. G. and Langevoort, H. L., The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* 1972. 46: 845-852.
- 108 Morrison, S. J., Uchida, N. and Weissman, I. L., The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995. 11: 35-71.
- 109 van Furth, R. and Cohn, Z. A., The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. *J Exp Med* 1968. 128: 415-435.
- 110 Gordon, S., Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 2003. 3: 23-35.
- 111 Gordon, S. and Taylor, P. R., Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005. 5: 953-964.
- 112 Mantovani, A., Sica, A. and Locati, M., New vistas on macrophage differentiation and activation. *Eur J Immunol* 2007. 37: 14-16.
- 113 Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. and Locati, M., The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 2004. 25: 677-686.
- 114 Meghari, S., Berruyer, C., Lepidi, H., Galland, F., Naquet, P. and Mege, J. L., Vanin-1 controls granuloma formation and macrophage polarization in *Coxiella burnetii* infection. *Eur J Immunol* 2007. 37: 24-32.
- 115 Coste, A., Dubourdeau, M., Linas, M. D., Cassaing, S., Lepert, J. C., Balard, P., Chalmeton, S., Bernad, J., Orfila, C., Seguela, J. P. and Pipy, B., PPARgamma promotes mannose receptor gene expression in murine macrophages and contributes to the induction of this receptor by IL-13. *Immunity* 2003. 19: 329-339.
- 116 Berry A. and Balard, P., Coste, A., Olagner, D., Lagane, C., Authier, H., Benoit-Vical, F., Lepert, J. C., Séguéla, J. P., Magnaval, J. F., Chambon, P., Metzger, D., Desvergne, B., Wahli, W., Auwerx, J. and Pipy, B., IL-13 induces expression of CD36 in human monocytes through PPAR-gamma activation. *Eur J Immunol* 2007. (in press).
- 117 Gallina, G., Dolcetti, L., Serafini, P., De Santo, C., Marigo, I., Colombo, M. P., Basso, G., Brombacher, F., Borrello, I., Zanovello, P., Bicchato, S. and Bronte, V., Tumors induce a subset of inflammatory monocytes with immunosuppressive activity on CD8+ T cells. *J Clin Invest* 2006. 116: 2777-2790.
- 118 Kzhyshkowska, J., Workman, G., Cardo-Vila, M., Arap, W., Pasqualini, R., Gratchev, A., Krusell, L., Goerdts, S. and Sage, E. H., Novel function of alternatively activated macrophages: stabilin-1-mediated clearance of SPARC. *J Immunol* 2006. 176: 5825-5832.

- 119 Ogawa, K., Funaba, M., Chen, Y. and Tsujimoto, M., **Activin A functions as a Th2 cytokine in the promotion of the alternative activation of macrophages.** *J Immunol* 2006. 177: 6787-6794.
- 120 Pesce, J., Kaviratne, M., Ramalingam, T. R., Thompson, R. W., Urban, J. F., Jr., Cheever, A. W., Young, D. A., Collins, M., Grusby, M. J. and Wynn, T. A., **The IL-21 receptor augments Th2 effector function and alternative macrophage activation.** *J Clin Invest* 2006. 116: 2044-2055.
- 121 Raes, G., Noel, W., Beschin, A., Brys, L., de Baetselier, P. and Hassanzadeh, G. H., **FIZZ1 and Ym as tools to discriminate between differentially activated macrophages.** *Dev Immunol* 2002. 9: 151-159.
- 122 Raes, G., De Baetselier, P., Noel, W., Beschin, A., Brombacher, F. and Hassanzadeh Gh, G., **Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages.** *J Leukoc Biol* 2002. 71: 597-602.
- 123 Webb, D. C., McKenzie, A. N. and Foster, P. S., **Expression of the Ym2 lectin-binding protein is dependent on interleukin (IL)-4 and IL-13 signal transduction: identification of a novel allergy-associated protein.** *J Biol Chem* 2001. 276: 41969-41976.
- 124 Wynn, T. A., **Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm.** *Nat Rev Immunol* 2004. 4: 583-594.
- 125 Noel, W., Raes, G., Hassanzadeh Ghassabeh, G., De Baetselier, P. and Beschin, A., **Alternatively activated macrophages during parasite infections.** *Trends Parasitol* 2004. 20: 126-133.
- 126 Maiti, P. K., Kumar, R. and Mohapatra, L. N., **Candidacidal activity of mouse macrophages in vitro.** *Infect Immun* 1980. 29: 477-482.
- 127 Rosseau, S., Seeger, W., Pralle, H. and Lohmeyer, J., **Phagocytosis of viable *Candida albicans* by alveolar macrophages: flow cytometric quantification.** *Am J Physiol* 1994. 267: L211-217.
- 128 Vazquez-Torres, A. and Balish, E., **Macrophages in resistance to candidiasis.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1997. 61: 170-192.
- 129 Marodi, L., Korchak, H. M. and Johnston, R. B., Jr., **Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages.** *J Immunol* 1991. 146: 2783-2789.
- 130 Morrison, R. P. and Cutler, J. E., **In vitro studies of the interaction of murine phagocytic cells with *Candida albicans*.** *J Reticuloendothel Soc* 1981. 29: 23-34.
- 131 Kitz, D. J., Stahl, P. D. and Little, J. R., **The effect of a mannose binding protein on macrophage interactions with *Candida albicans*.** *Cell Mol Biol* 1992. 38: 407-412.
- 132 Sato, T., Endo, Y., Matsushita, M. and Fujita, T., **Molecular characterization of a novel serine protease involved in activation of the complement system by mannose-binding protein.** *Int Immunol* 1994. 6: 665-669.
- 133 Janeway, C. A., Jr., **The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self.** *Immunol Today* 1992. 13: 11-16.
- 134 Muzio, M. and Mantovani, A., **Toll-like receptors.** *Microbes Infect* 2000. 2: 251-255.
- 135 Underhill, D. M. and Gantner, B., **Integration of Toll-like receptor and phagocytic signaling for tailored immunity.** *Microbes Infect* 2004. 6: 1368-1373.
- 136 Gantner, B. N., Simmons, R. M., Canavera, S. J., Akira, S. and Underhill, D. M., **Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2.** *J Exp Med* 2003. 197: 1107-1117.
- 137 Underhill, D. M. and Ozinsky, A., **Phagocytosis of microbes: complexity in action.** *Annu Rev Immunol* 2002. 20: 825-852.
- 138 Peiser, L., Mukhopadhyay, S. and Gordon, S., **Scavenger receptors in innate immunity.** *Curr Opin Immunol* 2002. 14: 123-128.
- 139 Platt, N. and Gordon, S., **Is the class A macrophage scavenger receptor (SR-A) multifunctional? - The mouse's tale.** *J Clin Invest* 2001. 108: 649-654.
- 140 Hampton, R. Y., Golenbock, D. T., Penman, M., Krieger, M. and Raetz, C. R., **Recognition and plasma clearance of endotoxin by scavenger receptors.** *Nature* 1991. 352: 342-344.
- 141 Dunne, D. W., Resnick, D., Greenberg, J., Krieger, M. and Joiner, K. A., **The type I macrophage scavenger receptor binds to gram-positive bacteria and recognizes lipoteichoic acid.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994. 91: 1863-1867.
- 142 Pontow, S. E., Kery, V. and Stahl, P. D., **Mannose receptor.** *Int Rev Cytol* 1992. 137B: 221-244.

- 143 Taylor, P. R., Gordon, S. and Martinez-Pomares, L., **The mannose receptor: linking homeostasis and immunity through sugar recognition.** *Trends Immunol* 2005. 26: 104-110.
- 144 Martinez-Pomares, L., Mahoney, J. A., Kaposzta, R., Linehan, S. A., Stahl, P. D. and Gordon, S., **A functional soluble form of the murine mannose receptor is produced by macrophages in vitro and is present in mouse serum.** *J Biol Chem* 1998. 273: 23376-23380.
- 145 Fraser, I. P., Takahashi, K., Koziel, H., Fardin, B., Harmsen, A. and Ezekowitz, R. A., **Pneumocystis carinii enhances soluble mannose receptor production by macrophages.** *Microbes Infect* 2000. 2: 1305-1310.
- 146 Linehan, S. A., Martinez-Pomares, L., Stahl, P. D. and Gordon, S., **Mannose receptor and its putative ligands in normal murine lymphoid and nonlymphoid organs: In situ expression of mannose receptor by selected macrophages, endothelial cells, perivascular microglia, and mesangial cells, but not dendritic cells.** *J Exp Med* 1999. 189: 1961-1972.
- 147 Coste, A., Linas, M. D., Cassaing, S., Bernad, J., Chalmeton, S., Seguela, J. P. and Pipy, B., **A sub-inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon-gamma- and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages.** *J Antimicrob Chemother* 2002. 49: 731-740.
- 148 Stein, M., Keshav, S., Harris, N. and Gordon, S., **Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation.** *J Exp Med* 1992. 176: 287-292.
- 149 Doyle, A. G., Herbein, G., Montaner, L. J., Minty, A. J., Caput, D., Ferrara, P. and Gordon, S., **Interleukin-13 alters the activation state of murine macrophages in vitro: comparison with interleukin-4 and interferon-gamma.** *Eur J Immunol* 1994. 24: 1441-1445.
- 150 Martinez-Pomares, L., Reid, D. M., Brown, G. D., Taylor, P. R., Stillion, R. J., Linehan, S. A., Zamze, S., Gordon, S. and Wong, S. Y., **Analysis of mannose receptor regulation by IL-4, IL-10, and proteolytic processing using novel monoclonal antibodies.** *J Leukoc Biol* 2003. 73: 604-613.
- 151 Alan, R., Ezekowitz, B., Hill, M. and Gordon, S., **Interferon alpha/beta selectively antagonises down-regulation of mannosyl-fucosyl receptors on activated macrophages by interferon gamma.** *Biochem Biophys Res Commun* 1986. 136: 737-744.
- 152 Clohisy, D. R., Bar-Shavit, Z., Chappel, J. C. and Teitelbaum, S. L., **1,25-Dihydroxyvitamin D3 modulates bone marrow macrophage precursor proliferation and differentiation. Up-regulation of the mannose receptor.** *J Biol Chem* 1987. 262: 15922-15929.
- 153 Harris, N., Super, M., Rits, M., Chang, G. and Ezekowitz, R. A., **Characterization of the murine macrophage mannose receptor: demonstration that the downregulation of receptor expression mediated by interferon-gamma occurs at the level of transcription.** *Blood* 1992. 80: 2363-2373.
- 154 Lefkowitz, D. L., Lincoln, J. A., Lefkowitz, S. S., Bollen, A. and Moguevsky, N., **Enhancement of macrophage-mediated bactericidal activity by macrophage-mannose receptor-ligand interaction.** *Immunol Cell Biol* 1997. 75: 136-141.
- 155 Shepherd, V. L., Lane, K. B. and Abdolrasulnia, R., **Ingestion of *Candida albicans* down-regulates mannose receptor expression on rat macrophages.** *Arch Biochem Biophys* 1997. 344: 350-356.
- 156 Schreiber, S., Perkins, S. L., Teitelbaum, S. L., Chappel, J., Stahl, P. D. and Blum, J. S., **Regulation of mouse bone marrow macrophage mannose receptor expression and activation by prostaglandin E and IFN-gamma.** *J Immunol* 1993. 151: 4973-4981.
- 157 Schreiber, S., Blum, J. S., Chappel, J. C., Stenson, W. F., Stahl, P. D., Teitelbaum, S. L. and Perkins, S. L., **Prostaglandin E specifically upregulates the expression of the mannose-receptor on mouse bone marrow-derived macrophages.** *Cell Regul* 1990. 1: 403-413.
- 158 Eichbaum, Q., Heney, D., Raveh, D., Chung, M., Davidson, M., Epstein, J. and Ezekowitz, R. A., **Murine macrophage mannose receptor promoter is regulated by the transcription factors PU.1 and SP1.** *Blood* 1997. 90: 4135-4143.
- 159 Taylor, P. R., Brown, G. D., Reid, D. M., Willment, J. A., Martinez-Pomares, L., Gordon, S. and Wong, S. Y., **The beta-glucan receptor, dectin-1, is predominantly expressed on the surface of cells of the monocyte/macrophage and neutrophil lineages.** *J Immunol* 2002. 169: 3876-3882.
- 160 Herre, J., Gordon, S. and Brown, G. D., **Dectin-1 and its role in the recognition of beta-glucans by macrophages.** *Mol Immunol* 2004. 40: 869-876.
- 161 Brown, G. D., Herre, J., Williams, D. L., Willment, J. A., Marshall, A. S. and Gordon, S., **Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans.** *J Exp Med* 2003. 197: 1119-1124.

- 162 Brown, G. D. and Gordon, S., Immune recognition. A new receptor for beta-glucans. *Nature* 2001. 413: 36-37.
- 163 Herre, J., Marshall, A. S., Caron, E., Edwards, A. D., Williams, D. L., Schweighoffer, E., Tybulewicz, V., Reis e Sousa, C., Gordon, S. and Brown, G. D., **Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages.** *Blood* 2004. 104: 4038-4045.
- 164 Underhill, D. M., Rossmagle, E., Lowell, C. A. and Simmons, R. M., **Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production.** *Blood* 2005. 106: 2543-2550.
- 165 Gantner, B. N., Simmons, R. M. and Underhill, D. M., **Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments.** *Embo J* 2005. 24: 1277-1286.
- 166 Babior, B. M., **NADPH oxidase: an update.** *Blood* 1999. 93: 1464-1476.
- 167 Rosen, G. M., Pou, S., Ramos, C. L., Cohen, M. S. and Britigan, B. E., **Free radicals and phagocytic cells.** *Faseb J* 1995. 9: 200-209.
- 168 Marodi, L., Schreiber, S., Anderson, D. C., MacDermott, R. P., Korchak, H. M. and Johnston, R. B., Jr., **Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors.** *J Clin Invest* 1993. 91: 2596-2601.
- 169 Sozzani, P., Cambon, C., Vita, N., Seguelas, M. H., Caput, D., Ferrara, P. and Pipy, B., **Interleukin-13 inhibits protein kinase C-triggered respiratory burst in human monocytes. Role of calcium and cyclic AMP.** *J Biol Chem* 1995. 270: 5084-5088.
- 170 Abramson, S. L. and Gallin, J. I., **IL-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes.** *J Immunol* 1990. 144: 625-630.
- 171 Phillips, W. A., Croatto, M. and Hamilton, J. A., **The effect of interleukin-4 on the macrophage respiratory burst is species dependent.** *Biochem Biophys Res Commun* 1992. 182: 727-732.
- 172 Leone, A. M., Palmer, R. M., Knowles, R. G., Francis, P. L., Ashton, D. S. and Moncada, S., **Constitutive and inducible nitric oxide synthases incorporate molecular oxygen into both nitric oxide and citrulline.** *J Biol Chem* 1991. 266: 23790-23795.
- 173 Moncada, S., Palmer, R. M. and Higgs, E. A., **Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.** *Pharmacol Rev* 1991. 43: 109-142.
- 174 Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J. and Balish, E., **Candidacidal activity of macrophages from immunocompetent and congenitally immunodeficient mice.** *J Infect Dis* 1994. 170: 180-188.
- 175 Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Warner, T. and Balish, E., **Nitric oxide enhances resistance of SCID mice to mucosal candidiasis.** *J Infect Dis* 1995. 172: 192-198.
- 176 Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J. and Balish, E., **Nitric oxide production does not directly increase macrophage candidacidal activity.** *Infect Immun* 1995. 63: 1142-1144.
- 177 Oswald, I. P. and James, S. L., **Nitrogen Oxide in Host Defense against Parasites.** *Methods* 1996. 10: 8-14.
- 178 Cenci, E., Romani, L., Mencacci, A., Spaccapelo, R., Schiaffella, E., Puccetti, P. and Bistoni, F., **Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*.** *Eur J Immunol* 1993. 23: 1034-1038.
- 179 Romani, L., Bistoni, F. and Puccetti, P., **Initiation of T-helper cell immunity to *Candida albicans* by IL-12: the role of neutrophils.** *Chem Immunol* 1997. 68: 110-135.
- 180 Romani, L., Puccetti, P. and Bistoni, F., **Interleukin-12 in infectious diseases.** *Clin Microbiol Rev* 1997. 10: 611-636.
- 181 Szabo, S. J., Jacobson, N. G., Dighe, A. S., Gubler, U. and Murphy, K. M., **Developmental commitment to the Th2 lineage by extinction of IL-12 signaling.** *Immunity* 1995. 2: 665-675.
- 182 Romani, L., Mencacci, A., Tonnetti, L., Spaccapelo, R., Cenci, E., Wolf, S., Puccetti, P. and Bistoni, F., **Interleukin-12 but not interferon-gamma production correlates with induction of T helper type-1 phenotype in murine candidiasis.** *Eur J Immunol* 1994. 24: 909-915.
- 183 Mencacci, A., Cenci, E., Del Sero, G., Fe d'Ostiani, C., Mosci, P., Trinchieri, G., Adorini, L. and Romani, L., **IL-10 is required for development of protective Th1 responses in IL-12-deficient mice upon *Candida albicans* infection.** *J Immunol* 1998. 161: 6228-6237.
- 184 Heufler, C., Koch, F., Stanzl, U., Topar, G., Wysocka, M., Trinchieri, G., Enk, A., Steinman, R. M., Romani, N. and Schuler, G., **Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells.** *Eur J Immunol* 1996. 26: 659-668.

- 185 Trinchieri, G., The two faces of interleukin 12: a pro-inflammatory cytokine and a key immunoregulatory molecule produced by antigen-presenting cells. *Ciba Found Symp* 1995. 195: 203-214; discussion 214-220.
- 186 Tonnetti, L., Spaccapelo, R., Cenci, E., Mencacci, A., Puccetti, P., Coffman, R. L., Bistoni, F. and Romani, L., Interleukin-4 and -10 exacerbate candidiasis in mice. *Eur J Immunol* 1995. 25: 1559-1565.
- 187 Ausiello, C. M., Urbani, F., Gessani, S., Spagnoli, G. C., Gomez, M. J. and Cassone, A., Cytokine gene expression in human peripheral blood mononuclear cells stimulated by mannoprotein constituents from *Candida albicans*. *Infect Immun* 1993. 61: 4105-4111.
- 188 Kullberg, B. J., van 't Wout, J. W., Hoogstraten, C. and van Furth, R., Recombinant interferon-gamma enhances resistance to acute disseminated *Candida albicans* infection in mice. *J Infect Dis* 1993. 168: 436-443.
- 189 Redmond, H. P., Shou, J., Gallagher, H. J., Kelly, C. J. and Daly, J. M., Macrophage-dependent candidacidal mechanisms in the murine system. Comparison of murine Kupffer cell and peritoneal macrophage candidacidal mechanisms. *J Immunol* 1993. 150: 3427-3433.
- 190 Romani, L., Cenci, E., Mencacci, A., Spaccapelo, R., Grohmann, U., Puccetti, P. and Bistoni, F., Gamma interferon modifies CD4+ subset expression in murine candidiasis. *Infect Immun* 1992. 60: 4950-4952.
- 191 Dinarello, C. A., IL-18: A TH1-inducing, proinflammatory cytokine and new member of the IL-1 family. *J Allergy Clin Immunol* 1999. 103: 11-24.
- 192 Novick, D., Kim, S. H., Fantuzzi, G., Reznikov, L. L., Dinarello, C. A. and Rubinstein, M., Interleukin-18 binding protein: a novel modulator of the Th1 cytokine response. *Immunity* 1999. 10: 127-136.
- 193 Djeu, J. Y., Blanchard, D. K., Richards, A. L. and Friedman, H., Tumor necrosis factor induction by *Candida albicans* from human natural killer cells and monocytes. *J Immunol* 1988. 141: 4047-4052.
- 194 Djeu, J. Y., Serbousek, D. and Blanchard, D. K., Release of tumor necrosis factor by human polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 1990. 76: 1405-1409.
- 195 Djeu, J. Y., Tumor necrosis factor and *Candida albicans*. *Behring Inst Mitt* 1991: 222-227.
- 196 Diamond, R. D., Lyman, C. A. and Wysong, D. R., Disparate effects of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on early neutrophil respiratory burst and fungicidal responses to *Candida albicans* hyphae in vitro. *J Clin Invest* 1991. 87: 711-720.
- 197 Netea, M. G., van Tits, L. J., Curfs, J. H., Amiot, F., Meis, J. F., van der Meer, J. W. and Kullberg, B. J., Increased susceptibility of TNF-alpha lymphotoxin-alpha double knockout mice to systemic candidiasis through impaired recruitment of neutrophils and phagocytosis of *Candida albicans*. *J Immunol* 1999. 163: 1498-1505.
- 198 Mencacci, A., Cenci, E., Del Sero, G., Fe d'Ostiani, C., Mosci, P., Montagnoli, C., Bacci, A., Bistoni, F., Quesniaux, V. F., Ryffel, B. and Romani, L., Defective co-stimulation and impaired Th1 development in tumor necrosis factor/lymphotoxin-alpha double-deficient mice infected with *Candida albicans*. *Int Immunol* 1998. 10: 37-48.
- 199 Mencacci, A., Spaccapelo, R., Del Sero, G., Enssle, K. H., Cassone, A., Bistoni, F. and Romani, L., CD4+ T-helper-cell responses in mice with low-level *Candida albicans* infection. *Infect Immun* 1996. 64: 4907-4914.
- 200 Romani, L., Mencacci, A., Grohmann, U., Mocci, S., Mosci, P., Puccetti, P. and Bistoni, F., Neutralizing antibody to interleukin 4 induces systemic protection and T helper type 1-associated immunity in murine candidiasis. *J Exp Med* 1992. 176: 19-25.
- 201 Puccetti, P., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Mosci, P., Enssle, K. H., Romani, L. and Bistoni, F., Cure of murine candidiasis by recombinant soluble interleukin-4 receptor. *J Infect Dis* 1994. 169: 1325-1331.
- 202 Kobayashi, M., Takahashi, H., Herndon, D. N., Pollard, R. B. and Suzuki, F., Effect of a combination therapy between IL-12 and soluble IL-4 receptor (sIL-4R) on *Candida albicans* and herpes simplex virus type I infections in thermally injured mice. *Can J Microbiol* 2002. 48: 886-894.
- 203 Mencacci, A., Del Sero, G., Cenci, E., d'Ostiani, C. F., Bacci, A., Montagnoli, C., Kopf, M. and Romani, L., Endogenous interleukin 4 is required for development of protective CD4+ T helper type 1 cell responses to *Candida albicans*. *J Exp Med* 1998. 187: 307-317.
- 204 D'Andrea, A., Ma, X., Aste-Amezaga, M., Paganin, C. and Trinchieri, G., Stimulatory and inhibitory effects of interleukin (IL)-4 and IL-13 on the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: priming for IL-12 and tumor necrosis factor alpha production. *J Exp Med* 1995. 181: 537-546.

- 205 Vazquez, N., Buckley, H. R. and Rogers, T. J., Production of IL-6 and TNF-alpha by the macrophage-like cell line RAW 264.7 after treatment with a cell wall extract of *Candida albicans*. *J Interferon Cytokine Res* 1996. 16: 465-470.
- 206 Allendoerfer, R., Magee, D. M., Smith, J. G., Bonewald, L. and Graybill, J. R., Induction of tumor necrosis factor-alpha in murine *Candida albicans* infection. *J Infect Dis* 1993. 167: 1168-1172.
- 207 Romani, L., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Toniatti, C., Puccetti, P., Bistoni, F. and Poli, V., Impaired neutrophil response and CD4+ T helper cell 1 development in interleukin 6-deficient mice infected with *Candida albicans*. *J Exp Med* 1996. 183: 1345-1355.
- 208 Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E. and Flavell, R. A., Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells. *J Exp Med* 1997. 185: 461-469.
- 209 Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., Vieira, P. and Mosmann, T. R., Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 1993. 11: 165-190.
- 210 Ding, L. and Shevach, E. M., IL-10 inhibits mitogen-induced T cell proliferation by selectively inhibiting macrophage costimulatory function. *J Immunol* 1992. 148: 3133-3139.
- 211 Fiorentino, D. F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W. and O'Garra, A., IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991. 146: 3444-3451.
- 212 Romani, L., Puccetti, P., Mencacci, A., Cenci, E., Spaccapelo, R., Tonnetti, L., Grohmann, U. and Bistoni, F., Neutralization of IL-10 up-regulates nitric oxide production and protects susceptible mice from challenge with *Candida albicans*. *J Immunol* 1994. 152: 3514-3521.
- 213 Del Sero, G., Mencacci, A., Cenci, E., d'Ostiani, C. F., Montagnoli, C., Bacci, A., Mosci, P., Kopf, M. and Romani, L., Antifungal type 1 responses are upregulated in IL-10-deficient mice. *Microbes Infect* 1999. 1: 1169-1180.
- 214 Roilides, E., Anastasiou-Katsiardani, A., Dimitriadou-Georgiadou, A., Kadiltoglou, I., Tsaparidou, S., Panteliadis, C. and Walsh, T. J., Suppressive effects of interleukin-10 on human mononuclear phagocyte function against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis* 1998. 178: 1734-1742.
- 215 Roilides, E., Sein, T., Schaufele, R., Chanock, S. J. and Walsh, T. J., Increased serum concentrations of interleukin-10 in patients with hepatosplenic candidiasis. *J Infect Dis* 1998. 178: 589-592.
- 216 Funk, C. D., Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science* 2001. 294: 1871-1875.
- 217 Marcinkiewicz, J., Prostanoids and MPO-halide system products as a link between innate and adaptive immunity. *Immunol Lett* 2003. 89: 187-191.
- 218 Six, D. A. and Dennis, E. A., The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* 2000. 1488: 1-19.
- 219 Narumiya, S., Sugimoto, Y. and Ushikubi, F., Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999. 79: 1193-1226.
- 220 Okuda-Ashitaka, E., Sakamoto, K., Giles, H., Ito, S. and Hayaishi, O., Cyclic-AMP-dependent Ca²⁺ influx elicited by prostaglandin D₂ in freshly isolated nonchromaffin cells from bovine adrenal medulla. *Biochim Biophys Acta* 1993. 1176: 148-154.
- 221 Sonnenburg, W. K. and Smith, W. L., Regulation of cyclic AMP metabolism in rabbit cortical collecting tubule cells by prostaglandins. *J Biol Chem* 1988. 263: 6155-6160.
- 222 Bonta, I. L., Adolfs, M. J. and Fieren, M. W., Cyclic AMP levels and their regulation by prostaglandins in peritoneal macrophages of rats and humans. *Int J Immunopharmacol* 1984. 6: 547-555.
- 223 Banan, A., Smith, G. S., Deshpande, Y., Rieckenberg, C. L., Kokoska, E. R. and Miller, T. A., Prostaglandins protect human intestinal cells against ethanol injury by stabilizing microtubules: role of protein kinase C and enhanced calcium efflux. *Dig Dis Sci* 1999. 44: 697-707.
- 224 Tilley, S. L., Coffman, T. M. and Koller, B. H., Mixed messages: modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes. *J Clin Invest* 2001. 108: 15-23.
- 225 Rocca, B. and FitzGerald, G. A., Cyclooxygenases and prostaglandins: shaping up the immune response. *Int Immunopharmacol* 2002. 2: 603-630.
- 226 Marcinkiewicz, J. and Chain, B. M., Differential cytokine regulation by eicosanoids in T cells primed by contact sensitisation with TNP. *Cell Immunol* 1993. 149: 303-314.

- 227 Marcinkiewicz, J., In vitro cytokine release by activated murine peritoneal macrophages: role of prostaglandins in the differential regulation of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6. *Cytokine* 1991. 3: 327-332.
- 228 Harizi, H., Juzan, M., Pitard, V., Moreau, J. F. and Gualde, N., Cyclooxygenase-2-issued prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol* 2002. 168: 2255-2263.
- 229 Kalinski, P., Schuitemaker, J. H., Hilkens, C. M. and Kapsenberg, M. L., Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol* 1998. 161: 2804-2809.
- 230 Jiang, C., Ting, A. T. and Seed, B., PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature* 1998. 391: 82-86.
- 231 FitzGerald, G. A. and Patrono, C., The coxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. *N Engl J Med* 2001. 345: 433-442.
- 232 Vaidya, S., Somers, E. P., Wright, S. D., Detmers, P. A. and Bansal, V. S., 15-Deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2 inhibits the beta2 integrin-dependent oxidative burst: involvement of a mechanism distinct from peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligation. *J Immunol* 1999. 163: 6187-6192.
- 233 Yu, K., Bayona, W., Kallen, C. B., Harding, H. P., Ravera, C. P., McMahon, G., Brown, M. and Lazar, M. A., Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* 1995. 270: 23975-23983.
- 234 Evans, R. M., The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988. 240: 889-895.
- 235 Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P. and Evans, R. M., The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* 1995. 83: 835-839.
- 236 Mangelsdorf, D. J. and Evans, R. M., The RXR heterodimers and orphan receptors. *Cell* 1995. 83: 841-850.
- 237 Giguere, V., Orphan nuclear receptors: from gene to function. *Endocr Rev* 1999. 20: 689-725.
- 238 Kostadinova, R., Wahli, W. and Michalik, L., PPARs in diseases: control mechanisms of inflammation. *Curr Med Chem* 2005. 12: 2995-3009.
- 239 Krey, G., Braissant, O., L'Horsset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M. G. and Wahli, W., Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* 1997. 11: 779-791.
- 240 Berger, J. and Moller, D. E., The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2002. 53: 409-435.
- 241 Hostetler, H. A., Petrescu, A. D., Kier, A. B. and Schroeder, F., Peroxisome proliferator-activated receptor alpha interacts with high affinity and is conformationally responsive to endogenous ligands. *J Biol Chem* 2005. 280: 18667-18682.
- 242 Schopfer, F. J., Lin, Y., Baker, P. R., Cui, T., Garcia-Barrio, M., Zhang, J., Chen, K., Chen, Y. E. and Freeman, B. A., Nitrolinoleic acid: an endogenous peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005. 102: 2340-2345.
- 243 Shiraki, T., Kamiya, N., Shiki, S., Kodama, T. S., Kakizuka, A. and Jingami, H., Alpha,beta-unsaturated ketone is a core moiety of natural ligands for covalent binding to peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem* 2005. 280: 14145-14153.
- 244 Wolfrum, C., Borrmann, C. M., Borchers, T. and Spener, F., Fatty acids and hypolipidemic drugs regulate peroxisome proliferator-activated receptors alpha - and gamma-mediated gene expression via liver fatty acid binding protein: a signaling path to the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001. 98: 2323-2328.
- 245 Tan, N. S., Shaw, N. S., Vinckenbosch, N., Liu, P., Yasmin, R., Desvergne, B., Wahli, W. and Noy, N., Selective cooperation between fatty acid binding proteins and peroxisome proliferator-activated receptors in regulating transcription. *Mol Cell Biol* 2002. 22: 5114-5127.
- 246 Olefsky, J. M., Nuclear receptor minireview series. *J Biol Chem* 2001. 276: 36863-36864.
- 247 Nolte, R. T., Wisely, G. B., Westin, S., Cobb, J. E., Lambert, M. H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M. G., Willson, T. M., Glass, C. K. and Milburn, M. V., Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 1998. 395: 137-143.
- 248 Glass, C. K., Going nuclear in metabolic and cardiovascular disease. *J Clin Invest* 2006. 116: 556-560.

- 249 Keller, H., Dreyer, C., Medin, J., Mahfoudi, A., Ozato, K. and Wahli, W., **Fatty acids and retinoids control lipid metabolism through activation of peroxisome proliferator-activated receptor-retinoid X receptor heterodimers.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. 90: 2160-2164.
- 250 Gearing, K. L., Gottlicher, M., Teboul, M., Widmark, E. and Gustafsson, J. A., **Interaction of the peroxisome-proliferator-activated receptor and retinoid X receptor.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993. 90: 1440-1444.
- 251 Juge-Aubry, C., Pernin, A., Favez, T., Burger, A. G., Wahli, W., Meier, C. A. and Desvergne, B., **DNA binding properties of peroxisome proliferator-activated receptor subtypes on various natural peroxisome proliferator response elements. Importance of the 5'-flanking region.** *J Biol Chem* 1997. 272: 25252-25259.
- 252 Feige, J. N., Gelman, L., Tudor, C., Engelborghs, Y., Wahli, W. and Desvergne, B., **Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand.** *J Biol Chem* 2005. 280: 17880-17890.
- 253 Palmer, C. N., Hsu, M. H., Griffin, H. J. and Johnson, E. F., **Novel sequence determinants in peroxisome proliferator signaling.** *J Biol Chem* 1995. 270: 16114-16121.
- 254 Schoonjans, K., Watanabe, M., Suzuki, H., Mahfoudi, A., Krey, G., Wahli, W., Grimaldi, P., Staels, B., Yamamoto, T. and Auwerx, J., **Induction of the acyl-coenzyme A synthetase gene by fibrates and fatty acids is mediated by a peroxisome proliferator response element in the C promoter.** *J Biol Chem* 1995. 270: 19269-19276.
- 255 A, I. J., Jeannin, E., Wahli, W. and Desvergne, B., **Polarity and specific sequence requirements of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)/retinoid X receptor heterodimer binding to DNA. A functional analysis of the malic enzyme gene PPAR response element.** *J Biol Chem* 1997. 272: 20108-20117.
- 256 McKenna, N. J. and O'Malley, B. W., **Combinatorial control of gene expression by nuclear receptors and coregulators.** *Cell* 2002. 108: 465-474.
- 257 Spiegelman, B. M. and Heinrich, R., **Biological control through regulated transcriptional coactivators.** *Cell* 2004. 119: 157-167.
- 258 Feige, J. N., Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B. and Wahli, W., **From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions.** *Prog Lipid Res* 2006. 45: 120-159.
- 259 Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G., **The coregulator exchange in transcriptional functions of nuclear receptors.** *Genes Dev* 2000. 14: 121-141.
- 260 Xu, H. E., Stanley, T. B., Montana, V. G., Lambert, M. H., Shearer, B. G., Cobb, J. E., McKee, D. D., Galardi, C. M., Plunket, K. D., Nolte, R. T., Parks, D. J., Moore, J. T., Kliewer, S. A., Willson, T. M. and Stimmel, J. B., **Structural basis for antagonist-mediated recruitment of nuclear co-repressors by PPARalpha.** *Nature* 2002. 415: 813-817.
- 261 Reichardt, H. M., Tuckermann, J. P., Gottlicher, M., Vujic, M., Weih, F., Angel, P., Herrlich, P. and Schutz, G., **Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor.** *Embo J* 2001. 20: 7168-7173.
- 262 Pascual, G., Fong, A. L., Ogawa, S., Gamliel, A., Li, A. C., Perissi, V., Rose, D. W., Willson, T. M., Rosenfeld, M. G. and Glass, C. K., **A SUMOylation-dependent pathway mediates transrepression of inflammatory response genes by PPAR-gamma.** *Nature* 2005. 437: 759-763.
- 263 Yang, X. Y., Wang, L. H., Chen, T., Hodge, D. R., Resau, J. H., DaSilva, L. and Farrar, W. L., **Activation of human T lymphocytes is inhibited by peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) agonists. PPARgamma co-association with transcription factor NFAT.** *J Biol Chem* 2000. 275: 4541-4544.
- 264 Gelman, L., Michalik, L., Desvergne, B. and Wahli, W., **Kinase signaling cascades that modulate peroxisome proliferator-activated receptors.** *Curr Opin Cell Biol* 2005. 17: 216-222.
- 265 Diradourian, C., Girard, J. and Pegorier, J. P., **Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance.** *Biochimie* 2005. 87: 33-38.
- 266 Yaacob, N. S., Norazmi, M. N., Gibson, G. G. and Kass, G. E., **The transcription of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene is regulated by protein kinase C.** *Toxicol Lett* 2001. 125: 133-141.
- 267 Tan, N. S., Michalik, L., Noy, N., Yasmin, R., Pacot, C., Heim, M., Fluhmann, B., Desvergne, B. and Wahli, W., **Critical roles of PPAR beta/delta in keratinocyte response to inflammation.** *Genes Dev* 2001. 15: 3263-3277.

- 268 Hauser, S., Adelmant, G., Sarraf, P., Wright, H. M., Mueller, E. and Spiegelman, B. M., **Degradation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma is linked to ligand-dependent activation.** *J Biol Chem* 2000. 275: 18527-18533.
- 269 Grossman, S. R., Deato, M. E., Brignone, C., Chan, H. M., Kung, A. L., Tagami, H., Nakatani, Y. and Livingston, D. M., **Polyubiquitination of p53 by a ubiquitin ligase activity of p300.** *Science* 2003. 300: 342-344.
- 270 Dennis, A. P. and O'Malley, B. W., **Rush hour at the promoter: how the ubiquitin-proteasome pathway polices the traffic flow of nuclear receptor-dependent transcription.** *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005. 93: 139-151.
- 271 Reid, G., Hubner, M. R., Metivier, R., Brand, H., Denger, S., Manu, D., Beaudouin, J., Ellenberg, J. and Gannon, F., **Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ERalpha on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling.** *Mol Cell* 2003. 11: 695-707.
- 272 Hay, R. T., **SUMO: a history of modification.** *Mol Cell* 2005. 18: 1-12.
- 273 Ohshima, T., Koga, H. and Shimotohno, K., **Transcriptional activity of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is modulated by SUMO-1 modification.** *J Biol Chem* 2004. 279: 29551-29557.
- 274 Yamashita, D., Yamaguchi, T., Shimizu, M., Nakata, N., Hirose, F. and Osumi, T., **The transactivating function of peroxisome proliferator-activated receptor gamma is negatively regulated by SUMO conjugation in the amino-terminal domain.** *Genes Cells* 2004. 9: 1017-1029.
- 275 Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W., **Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily.** *Science* 1995. 270: 1354-1357.
- 276 Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S. C., Heyman, R. A., Rose, D. W., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G., **A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors.** *Cell* 1996. 85: 403-414.
- 277 Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D. L. and Stallcup, M. R., **GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. 93: 4948-4952.
- 278 Voegel, J. J., Heine, M. J., Zechel, C., Chambon, P. and Gronemeyer, H., **TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors.** *Embo J* 1996. 15: 3667-3675.
- 279 Torchia, J., Rose, D. W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G., **The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function.** *Nature* 1997. 387: 677-684.
- 280 Anzick, S. L., Kononen, J., Walker, R. L., Azorsa, D. O., Tanner, M. M., Guan, X. Y., Sauter, G., Kallioniemi, O. P., Trent, J. M. and Meltzer, P. S., **AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer.** *Science* 1997. 277: 965-968.
- 281 Chen, H., Lin, R. J., Schiltz, R. L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M. L., Nakatani, Y. and Evans, R. M., **Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300.** *Cell* 1997. 90: 569-580.
- 282 Li, H., Gomes, P. J. and Chen, J. D., **RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997. 94: 8479-8484.
- 283 Takeshita, A., Yen, P. M., Misiti, S., Cardona, G. R., Liu, Y. and Chin, W. W., **Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator.** *Endocrinology* 1996. 137: 3594-3597.
- 284 Chakravarti, D., LaMorte, V. J., Nelson, M. C., Nakajima, T., Schulman, I. G., Juguillon, H., Montminy, M. and Evans, R. M., **Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling.** *Nature* 1996. 383: 99-103.
- 285 Fondell, J. D., Ge, H. and Roeder, R. G., **Ligand induction of a transcriptionally active thyroid hormone receptor coactivator complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996. 93: 8329-8333.
- 286 Rachez, C., Suldan, Z., Ward, J., Chang, C. P., Burakov, D., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P. and Freedman, L. P., **A novel protein complex that interacts with the vitamin D3 receptor in a ligand-dependent manner and enhances VDR transactivation in a cell-free system.** *Genes Dev* 1998. 12: 1787-1800.
- 287 Nawaz, Z., Lonard, D. M., Smith, C. L., Lev-Lehman, E., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W., **The Angelman syndrome-associated protein, E6-AP, is a coactivator for the nuclear hormone receptor superfamily.** *Mol Cell Biol* 1999. 19: 1182-1189.

- 288 Fryer, C. J. and Archer, T. K., **Chromatin remodelling by the glucocorticoid receptor requires the BRG1 complex.** *Nature* 1998. 393: 88-91.
- 289 Yoshinaga, S. K., Peterson, C. L., Herskowitz, I. and Yamamoto, K. R., **Roles of SWI1, SWI2, and SWI3 proteins for transcriptional enhancement by steroid receptors.** *Science* 1992. 258: 1598-1604.
- 290 Lanz, R. B., McKenna, N. J., Onate, S. A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W., **A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex.** *Cell* 1999. 97: 17-27.
- 291 Chen, D., Ma, H., Hong, H., Koh, S. S., Huang, S. M., Schurter, B. T., Aswad, D. W. and Stallcup, M. R., **Regulation of transcription by a protein methyltransferase.** *Science* 1999. 284: 2174-2177.
- 292 Wang, H., Huang, Z. Q., Xia, L., Feng, Q., Erdjument-Bromage, H., Strahl, B. D., Briggs, S. D., Allis, C. D., Wong, J., Tempst, P. and Zhang, Y., **Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor.** *Science* 2001. 293: 853-857.
- 293 Naar, A. M., Lemon, B. D. and Tjian, R., **Transcriptional coactivator complexes.** *Annu Rev Biochem* 2001. 70: 475-501.
- 294 Heery, D. M., Kalkhoven, E., Hoare, S. and Parker, M. G., **A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors.** *Nature* 1997. 387: 733-736.
- 295 Bannister, A. J. and Kouzarides, T., **The CBP co-activator is a histone acetyltransferase.** *Nature* 1996. 384: 641-643.
- 296 Yang, X. J., Ogrzyzko, V. V., Nishikawa, J., Howard, B. H. and Nakatani, Y., **A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A.** *Nature* 1996. 382: 319-324.
- 297 Spencer, T. E., Jenster, G., Burcin, M. M., Allis, C. D., Zhou, J., Mizzen, C. A., McKenna, N. J., Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. and O'Malley, B. W., **Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase.** *Nature* 1997. 389: 194-198.
- 298 Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. and et al., **Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor.** *Nature* 1995. 377: 397-404.
- 299 Chen, J. D. and Evans, R. M., **A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors.** *Nature* 1995. 377: 454-457.
- 300 Hu, X. and Lazar, M. A., **The CoRNR motif controls the recruitment of corepressors by nuclear hormone receptors.** *Nature* 1999. 402: 93-96.
- 301 Heinzl, T., Lavinsky, R. M., Mullen, T. M., Soderstrom, M., Laherty, C. D., Torchia, J., Yang, W. M., Brard, G., Ngo, S. D., Davie, J. R., Seto, E., Eisenman, R. N., Rose, D. W., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G., **A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression.** *Nature* 1997. 387: 43-48.
- 302 Perissi, V. and Rosenfeld, M. G., **Controlling nuclear receptors: the circular logic of cofactor cycles.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005. 6: 542-554.
- 303 Perissi, V., Aggarwal, A., Glass, C. K., Rose, D. W. and Rosenfeld, M. G., **A corepressor/coactivator exchange complex required for transcriptional activation by nuclear receptors and other regulated transcription factors.** *Cell* 2004. 116: 511-526.
- 304 Braissant, O., Fougère, F., Scotto, C., Dauca, M. and Wahli, W., **Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): tissue distribution of PPAR-alpha, -beta, and -gamma in the adult rat.** *Endocrinology* 1996. 137: 354-366.
- 305 Auboeuf, D., Rieusset, J., Fajas, L., Vallier, P., Fréring, V., Riou, J. P., Staels, B., Auwerx, J., Laville, M. and Vidal, H., **Tissue distribution and quantification of the expression of mRNAs of peroxisome proliferator-activated receptors and liver X receptor-alpha in humans: no alteration in adipose tissue of obese and NIDDM patients.** *Diabetes* 1997. 46: 1319-1327.
- 306 Inoue, I., Shino, K., Noji, S., Awata, T. and Katayama, S., **Expression of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha) in primary cultures of human vascular endothelial cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 1998. 246: 370-374.
- 307 Diep, Q. N., Touyz, R. M. and Schiffrin, E. L., **Docosahexaenoic acid, a peroxisome proliferator-activated receptor-alpha ligand, induces apoptosis in vascular smooth muscle cells by stimulation of p38 mitogen-activated protein kinase.** *Hypertension* 2000. 36: 851-855.
- 308 Staels, B., Koenig, W., Habib, A., Merval, R., Lebre, M., Torra, I. P., Delerive, P., Fadel, A., Chinetti, G., Fruchart, J. C., Najib, J., Maclouf, J. and Tedgui, A., **Activation of human**

- aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 1998. 393: 790-793.
- 309 Chinetti, G., Griglio, S., Antonucci, M., Torra, I. P., Delerive, P., Majd, Z., Fruchart, J. C., Chapman, J., Najib, J. and Staels, B., **Activation of proliferator-activated receptors alpha and gamma induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages.** *J Biol Chem* 1998. 273: 25573-25580.
- 310 Motojima, K., Passilly, P., Peters, J. M., Gonzalez, F. J. and Latruffe, N., **Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner.** *J Biol Chem* 1998. 273: 16710-16714.
- 311 Yu, S., Rao, S. and Reddy, J. K., **Peroxisome proliferator-activated receptors, fatty acid oxidation, steatohepatitis and hepatocarcinogenesis.** *Curr Mol Med* 2003. 3: 561-572.
- 312 Schoonjans, K., Peinado-Onsurbe, J., Lefebvre, A. M., Heyman, R. A., Briggs, M., Deeb, S., Staels, B. and Auwerx, J., **PPARalpha and PPARgamma activators direct a distinct tissue-specific transcriptional response via a PPRE in the lipoprotein lipase gene.** *Embo J* 1996. 15: 5336-5348.
- 313 Staels, B., Vu-Dac, N., Kosykh, V. A., Saladin, R., Fruchart, J. C., Dallongeville, J. and Auwerx, J., **Fibrates downregulate apolipoprotein C-III expression independent of induction of peroxisomal acyl coenzyme A oxidase. A potential mechanism for the hypolipidemic action of fibrates.** *J Clin Invest* 1995. 95: 705-712.
- 314 Vosper, H., Khoudoli, G. A., Graham, T. L. and Palmer, C. N., **Peroxisome proliferator-activated receptor agonists, hyperlipidaemia, and atherosclerosis.** *Pharmacol Ther* 2002. 95: 47-62.
- 315 Vu-Dac, N., Chopin-Delannoy, S., Gervois, P., Bonnelye, E., Martin, G., Fruchart, J. C., Laudet, V. and Staels, B., **The nuclear receptors peroxisome proliferator-activated receptor alpha and Rev-erbalpha mediate the species-specific regulation of apolipoprotein A-I expression by fibrates.** *J Biol Chem* 1998. 273: 25713-25720.
- 316 Chinetti, G., Lestavel, S., Bocher, V., Remaley, A. T., Neve, B., Torra, I. P., Teissier, E., Minnich, A., Jaye, M., Duverger, N., Brewer, H. B., Fruchart, J. C., Clavey, V. and Staels, B., **PPAR-alpha and PPAR-gamma activators induce cholesterol removal from human macrophage foam cells through stimulation of the ABCA1 pathway.** *Nat Med* 2001. 7: 53-58.
- 317 Knight, B. L., Patel, D. D., Humphreys, S. M., Wiggins, D. and Gibbons, G. F., **Inhibition of cholesterol absorption associated with a PPAR alpha-dependent increase in ABC binding cassette transporter A1 in mice.** *J Lipid Res* 2003. 44: 2049-2058.
- 318 Marx, N., Sukhova, G. K., Collins, T., Libby, P. and Plutzky, J., **PPARalpha activators inhibit cytokine-induced vascular cell adhesion molecule-1 expression in human endothelial cells.** *Circulation* 1999. 99: 3125-3131.
- 319 Goya, K., Sumitani, S., Xu, X., Kitamura, T., Yamamoto, H., Kurebayashi, S., Saito, H., Kouhara, H., Kasayama, S. and Kawase, I., **Peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonists increase nitric oxide synthase expression in vascular endothelial cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004. 24: 658-663.
- 320 Marx, N., Mackman, N., Schonbeck, U., Yilmaz, N., Hombach, V., Libby, P. and Plutzky, J., **PPARalpha activators inhibit tissue factor expression and activity in human monocytes.** *Circulation* 2001. 103: 213-219.
- 321 Shu, H., Wong, B., Zhou, G., Li, Y., Berger, J., Woods, J. W., Wright, S. D. and Cai, T. Q., **Activation of PPARalpha or gamma reduces secretion of matrix metalloproteinase 9 but not interleukin 8 from human monocyte THP-1 cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2000. 267: 345-349.
- 322 Dressel, U., Allen, T. L., Pippal, J. B., Rohde, P. R., Lau, P. and Muscat, G. E., **The peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta agonist, GW501516, regulates the expression of genes involved in lipid catabolism and energy uncoupling in skeletal muscle cells.** *Mol Endocrinol* 2003. 17: 2477-2493.
- 323 Tanaka, T., Yamamoto, J., Iwasaki, S., Asaba, H., Hamura, H., Ikeda, Y., Watanabe, M., Magoori, K., Ioka, R. X., Tachibana, K., Watanabe, Y., Uchiyama, Y., Sumi, K., Iguchi, H., Ito, S., Doi, T., Hamakubo, T., Naito, M., Auwerx, J., Yanagisawa, M., Kodama, T. and Sakai, J., **Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003. 100: 15924-15929.
- 324 Schmuth, M., Haqq, C. M., Cairns, W. J., Holder, J. C., Dorsam, S., Chang, S., Lau, P., Fowler, A. J., Chuang, G., Moser, A. H., Brown, B. E., Mao-Qiang, M., Uchida, Y.,

- Schoonjans, K., Auwerx, J., Chambon, P., Willson, T. M., Elias, P. M. and Feingold, K. R., **Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-beta/delta stimulates differentiation and lipid accumulation in keratinocytes.** *J Invest Dermatol* 2004. 122: 971-983.
- 325 Berger, J., Leibowitz, M. D., Doebber, T. W., Elbrecht, A., Zhang, B., Zhou, G., Biswas, C., Cullinan, C. A., Hayes, N. S., Li, Y., Tanen, M., Ventre, J., Wu, M. S., Berger, G. D., Mosley, R., Marquis, R., Santini, C., Sahoo, S. P., Tolman, R. L., Smith, R. G. and Moller, D. E., **Novel peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) gamma and PPARdelta ligands produce distinct biological effects.** *J Biol Chem* 1999. 274: 6718-6725.
- 326 Wolf, G., **The function of the nuclear receptor peroxisome proliferator-activated receptor delta in energy homeostasis.** *Nutr Rev* 2003. 61: 387-390.
- 327 Lim, H., Gupta, R. A., Ma, W. G., Paria, B. C., Moller, D. E., Morrow, J. D., DuBois, R. N., Trzaskos, J. M. and Dey, S. K., **Cyclo-oxygenase-2-derived prostacyclin mediates embryo implantation in the mouse via PPARdelta.** *Genes Dev* 1999. 13: 1561-1574.
- 328 Ding, N. Z., Ma, X. H., Diao, H. L., Xu, L. B. and Yang, Z. M., **Differential expression of peroxisome proliferator-activated receptor delta at implantation sites and in decidual cells of rat uterus.** *Reproduction* 2003. 125: 817-825.
- 329 He, T. C., Chan, T. A., Vogelstein, B. and Kinzler, K. W., **PPARdelta is an APC-regulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs.** *Cell* 1999. 99: 335-345.
- 330 Barak, Y., Liao, D., He, W., Ong, E. S., Nelson, M. C., Olefsky, J. M., Boland, R. and Evans, R. M., **Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placentation, adiposity, and colorectal cancer.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002. 99: 303-308.
- 331 Harman, F. S., Nicol, C. J., Marin, H. E., Ward, J. M., Gonzalez, F. J. and Peters, J. M., **Peroxisome proliferator-activated receptor-delta attenuates colon carcinogenesis.** *Nat Med* 2004. 10: 481-483.
- 332 Moreno, S., Farioli-Vecchioli, S. and Ceru, M. P., **Immunolocalization of peroxisome proliferator-activated receptors and retinoid X receptors in the adult rat CNS.** *Neuroscience* 2004. 123: 131-145.
- 333 Xing, G., Zhang, L., Zhang, L., Heynen, T., Yoshikawa, T., Smith, M., Weiss, S. and Detera-Wadleigh, S., **Rat PPAR delta contains a CGG triplet repeat and is prominently expressed in the thalamic nuclei.** *Biochem Biophys Res Commun* 1995. 217: 1015-1025.
- 334 Saluja, I., Granneman, J. G. and Skoff, R. P., **PPAR delta agonists stimulate oligodendrocyte differentiation in tissue culture.** *Glia* 2001. 33: 191-204.
- 335 Basu-Modak, S., Braissant, O., Escher, P., Desvergne, B., Honegger, P. and Wahli, W., **Peroxisome proliferator-activated receptor beta regulates acyl-CoA synthetase 2 in reaggregated rat brain cell cultures.** *J Biol Chem* 1999. 274: 35881-35888.
- 336 Smith, S. A., Monteith, G. R., Robinson, J. A., Venkata, N. G., May, F. J. and Roberts-Thomson, S. J., **Effect of the peroxisome proliferator-activated receptor beta activator GW0742 in rat cultured cerebellar granule neurons.** *J Neurosci Res* 2004. 77: 240-249.
- 337 Fajas, L., Auboeuf, D., Raspe, E., Schoonjans, K., Lefebvre, A. M., Saladin, R., Najib, J., Laville, M., Fruchart, J. C., Deeb, S., Vidal-Puig, A., Flier, J., Briggs, M. R., Staels, B., Vidal, H. and Auwerx, J., **The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene.** *J Biol Chem* 1997. 272: 18779-18789.
- 338 Fajas, L., Fruchart, J. C. and Auwerx, J., **PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter.** *FEBS Lett* 1998. 438: 55-60.
- 339 Ricote, M., Huang, J., Fajas, L., Li, A., Welch, J., Najib, J., Witztum, J. L., Auwerx, J., Palinski, W. and Glass, C. K., **Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998. 95: 7614-7619.
- 340 Forman, B. M., Tontonoz, P., Chen, J., Brun, R. P., Spiegelman, B. M. and Evans, R. M., **15-Deoxy-delta 12, 14-prostaglandin J2 is a ligand for the adipocyte determination factor PPAR gamma.** *Cell* 1995. 83: 803-812.
- 341 Nagy, L., Tontonoz, P., Alvarez, J. G., Chen, H. and Evans, R. M., **Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma.** *Cell* 1998. 93: 229-240.
- 342 Willson, T. M., Cobb, J. E., Cowan, D. J., Wiethe, R. W., Correa, I. D., Prakash, S. R., Beck, K. D., Moore, L. B., Kliewer, S. A. and Lehmann, J. M., **The structure-activity relationship between peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonism and the antihyperglycemic activity of thiazolidinediones.** *J Med Chem* 1996. 39: 665-668.

- 343 Shibata, T., Matsui, K., Nagao, K., Shinkai, H., Yonemori, F. and Wakitani, K., **Pharmacological profiles of a novel oral antidiabetic agent, JTT-501, an isoxazolidinedione derivative.** *Eur J Pharmacol* 1999. 364: 211-219.
- 344 Cobb, J. E., Blanchard, S. G., Boswell, E. G., Brown, K. K., Charifson, P. S., Cooper, J. P., Collins, J. L., Dezube, M., Henke, B. R., Hull-Ryde, E. A., Lake, D. H., Lenhard, J. M., Oliver, W., Jr., Oplinger, J., Pentti, M., Parks, D. J., Plunket, K. D. and Tong, W. Q., **N-(2-Benzoylphenyl)-L-tyrosine PPARgamma agonists. 3. Structure-activity relationship and optimization of the N-aryl substituent.** *J Med Chem* 1998. 41: 5055-5069.
- 345 Suh, N., Wang, Y., Williams, C. R., Risingsong, R., Gilmer, T., Willson, T. M. and Sporn, M. B., **A new ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma), GW7845, inhibits rat mammary carcinogenesis.** *Cancer Res* 1999. 59: 5671-5673.
- 346 Wang, Y., Porter, W. W., Suh, N., Honda, T., Gribble, G. W., Leesnitzer, L. M., Plunket, K. D., Mangelsdorf, D. J., Blanchard, S. G., Willson, T. M. and Sporn, M. B., **A synthetic triterpenoid, 2-cyano-3,12-dioxoleana-1,9-dien-28-oic acid (CDDO), is a ligand for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma.** *Mol Endocrinol* 2000. 14: 1550-1556.
- 347 Wright, H. M., Clish, C. B., Mikami, T., Hauser, S., Yanagi, K., Hiramatsu, R., Serhan, C. N. and Spiegelman, B. M., **A synthetic antagonist for the peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits adipocyte differentiation.** *J Biol Chem* 2000. 275: 1873-1877.
- 348 Mukherjee, R., Hoener, P. A., Jow, L., Bilakovics, J., Klausning, K., Mais, D. E., Faulkner, A., Croston, G. E. and Paterniti, J. R., Jr., **A selective peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARgamma) modulator blocks adipocyte differentiation but stimulates glucose uptake in 3T3-L1 adipocytes.** *Mol Endocrinol* 2000. 14: 1425-1433.
- 349 Hwang, B. Y., Lee, J. H., Nam, J. B., Kim, H. S., Hong, Y. S. and Lee, J. J., **Two new furanoditerpenes from *Saururus chinensis* and their effects on the activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma.** *J Nat Prod* 2002. 65: 616-617.
- 350 Kuroda, M., Mimaki, Y., Sashida, Y., Mae, T., Kishida, H., Nishiyama, T., Tsukagawa, M., Konishi, E., Takahashi, K., Kawada, T., Nakagawa, K. and Kitahara, M., **Phenolics with PPAR-gamma ligand-binding activity obtained from licorice (*Glycyrrhiza uralensis* roots) and ameliorative effects of glycyrrin on genetically diabetic KK-A(y) mice.** *Bioorg Med Chem Lett* 2003. 13: 4267-4272.
- 351 Shao, D. and Lazar, M. A., **Peroxisome proliferator activated receptor gamma, CCAAT/enhancer-binding protein alpha, and cell cycle status regulate the commitment to adipocyte differentiation.** *J Biol Chem* 1997. 272: 21473-21478.
- 352 Wu, Z., Rosen, E. D., Brun, R., Hauser, S., Adelmant, G., Troy, A. E., McKeon, C., Darlington, G. J. and Spiegelman, B. M., **Cross-regulation of C/EBP alpha and PPAR gamma controls the transcriptional pathway of adipogenesis and insulin sensitivity.** *Mol Cell* 1999. 3: 151-158.
- 353 Okuno, A., Tamemoto, H., Tobe, K., Ueki, K., Mori, Y., Iwamoto, K., Umesono, K., Akanuma, Y., Fujiwara, T., Horikoshi, H., Yazaki, Y. and Kadowaki, T., **Troglitazone increases the number of small adipocytes without the change of white adipose tissue mass in obese Zucker rats.** *J Clin Invest* 1998. 101: 1354-1361.
- 354 Hallakou, S., Doare, L., Fougelle, F., Kergoat, M., Guerre-Millo, M., Berthault, M. F., Dugail, I., Morin, J., Auwerx, J. and Ferre, P., **Pioglitazone induces in vivo adipocyte differentiation in the obese Zucker fa/fa rat.** *Diabetes* 1997. 46: 1393-1399.
- 355 Tontonoz, P., Nagy, L., Alvarez, J. G., Thomazy, V. A. and Evans, R. M., **PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL.** *Cell* 1998. 93: 241-252.
- 356 Pasceri, V., Wu, H. D., Willerson, J. T. and Yeh, E. T., **Modulation of vascular inflammation in vitro and in vivo by peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activators.** *Circulation* 2000. 101: 235-238.
- 357 Marx, N., Sukhova, G., Murphy, C., Libby, P. and Plutzky, J., **Macrophages in human atheroma contain PPARgamma: differentiation-dependent peroxisomal proliferator-activated receptor gamma(PPARgamma) expression and reduction of MMP-9 activity through PPARgamma activation in mononuclear phagocytes in vitro.** *Am J Pathol* 1998. 153: 17-23.
- 358 Wakino, S., Kintscher, U., Kim, S., Yin, F., Hsueh, W. A. and Law, R. E., **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit retinoblastoma phosphorylation and G1-> S transition in vascular smooth muscle cells.** *J Biol Chem* 2000. 275: 22435-22441.
- 359 Takeda, K., Ichiki, T., Tokunou, T., Funakoshi, Y., Iino, N., Hirano, K., Kanaide, H. and Takeshita, A., **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators downregulate**

- angiotensin II type 1 receptor in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2000. 102: 1834-1839.
- 360 Akiyama, T. E., Sakai, S., Lambert, G., Nicol, C. J., Matsusue, K., Pimprale, S., Lee, Y. H., Ricote, M., Glass, C. K., Brewer, H. B., Jr. and Gonzalez, F. J., **Conditional disruption of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene in mice results in lowered expression of ABCA1, ABCG1, and apoE in macrophages and reduced cholesterol efflux.** *Mol Cell Biol* 2002. 22: 2607-2619.
- 361 Chinetti, G., Gbaguidi, F. G., Griglio, S., Mallat, Z., Antonucci, M., Poulain, P., Chapman, J., Fruchart, J. C., Tedgui, A., Najib-Fruchart, J. and Staels, B., **CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors.** *Circulation* 2000. 101: 2411-2417.
- 362 Chawla, A., Boisvert, W. A., Lee, C. H., Laffitte, B. A., Barak, Y., Joseph, S. B., Liao, D., Nagy, L., Edwards, P. A., Curtiss, L. K., Evans, R. M. and Tontonoz, P., **A PPAR gamma-LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis.** *Mol Cell* 2001. 7: 161-171.
- 363 Shibasaki, M., Takahashi, K., Ito, T., Bujo, H. and Saito, Y., **A PPAR agonist improves TNF-alpha-induced insulin resistance of adipose tissue in mice.** *Biochem Biophys Res Commun* 2003. 309: 419-424.
- 364 Shimaya, A., Noshiro, O., Hirayama, R., Yoneta, T., Niigata, K. and Shikama, H., **Insulin sensitizer YM268 ameliorates insulin resistance by normalizing the decreased content of GLUT4 in adipose tissue of obese Zucker rats.** *Eur J Endocrinol* 1997. 137: 693-700.
- 365 Shojima, N., Sakoda, H., Ogihara, T., Fujishiro, M., Katagiri, H., Anai, M., Onishi, Y., Ono, H., Inukai, K., Abe, M., Fukushima, Y., Kikuchi, M., Oka, Y. and Asano, T., **Humoral regulation of resistin expression in 3T3-L1 and mouse adipose cells.** *Diabetes* 2002. 51: 1737-1744.
- 366 Kausch, C., Krutzfeldt, J., Witke, A., Rettig, A., Bachmann, O., Rett, K., Matthaei, S., Machicao, F., Haring, H. U. and Stumvoll, M., **Effects of troglitazone on cellular differentiation, insulin signaling, and glucose metabolism in cultured human skeletal muscle cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001. 280: 664-674.
- 367 Olefsky, J. M. and Saltiel, A. R., **PPAR gamma and the treatment of insulin resistance.** *Trends Endocrinol Metab* 2000. 11: 362-368.
- 368 Demetri, G. D., Fletcher, C. D., Mueller, E., Sarraf, P., Naujoks, R., Campbell, N., Spiegelman, B. M. and Singer, S., **Induction of solid tumor differentiation by the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand troglitazone in patients with liposarcoma.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999. 96: 3951-3956.
- 369 Murata, T., He, S., Hangai, M., Ishibashi, T., Xi, X. P., Kim, S., Hsueh, W. A., Ryan, S. J., Law, R. E. and Hinton, D. R., **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligands inhibit choroidal neovascularization.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000. 41: 2309-2317.
- 370 Aoun, P., Simpkins, J. W. and Agarwal, N., **Role of PPAR-gamma ligands in neuroprotection against glutamate-induced cytotoxicity in retinal ganglion cells.** *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003. 44: 2999-3004.
- 371 Zhang, X. and Young, H. A., **PPAR and immune system--what do we know?** *Int Immunopharmacol* 2002. 2: 1029-1044.
- 372 Zhang, X., Rodriguez-Galan, M. C., Subleski, J. J., Ortaldo, J. R., Hodge, D. L., Wang, J. M., Shimozato, O., Reynolds, D. A. and Young, H. A., **Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and its ligands attenuate biologic functions of human natural killer cells.** *Blood* 2004. 104: 3276-3284.
- 373 Marx, N., Kehrle, B., Kohlhammer, K., Grub, M., Koenig, W., Hombach, V., Libby, P. and Plutzky, J., **PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis.** *Circ Res* 2002. 90: 703-710.
- 374 Chtanova, T., Kemp, R. A., Sutherland, A. P., Ronchese, F. and Mackay, C. R., **Gene microarrays reveal extensive differential gene expression in both CD4(+) and CD8(+) type 1 and type 2 T cells.** *J Immunol* 2001. 167: 3057-3063.
- 375 Floyd, Z. E. and Stephens, J. M., **Interferon-gamma-mediated activation and ubiquitin-proteasome-dependent degradation of PPARgamma in adipocytes.** *J Biol Chem* 2002. 277: 4062-4068.
- 376 Tanaka, K., Ogawa, K., Sugamura, K., Nakamura, M., Takano, S. and Nagata, K., **Cutting edge: differential production of prostaglandin D2 by human helper T cell subsets.** *J Immunol* 2000. 164: 2277-2280.

- 377 Nagata, K., Tanaka, K., Ogawa, K., Kemmotsu, K., Imai, T., Yoshie, O., Abe, H., Tada, K., Nakamura, M., Sugamura, K. and Takano, S., **Selective expression of a novel surface molecule by human Th2 cells in vivo.** *J Immunol* 1999. 162: 1278-1286.
- 378 Hirai, H., Tanaka, K., Yoshie, O., Ogawa, K., Kenmotsu, K., Takamori, Y., Ichimasa, M., Sugamura, K., Nakamura, M., Takano, S. and Nagata, K., **Prostaglandin D2 selectively induces chemotaxis in T helper type 2 cells, eosinophils, and basophils via seven-transmembrane receptor CRTH2.** *J Exp Med* 2001. 193: 255-261.
- 379 Abe, H., Takeshita, T., Nagata, K., Arita, T., Endo, Y., Fujita, T., Takayama, H., Kubo, M. and Sugamura, K., **Molecular cloning, chromosome mapping and characterization of the mouse CRTH2 gene, a putative member of the leukocyte chemoattractant receptor family.** *Gene* 1999. 227: 71-77.
- 380 Ho, I. C., Arm, J. P., Bingham, C. O., 3rd, Choi, A., Austen, K. F. and Glimcher, L. H., **A novel group of phospholipase A2s preferentially expressed in type 2 helper T cells.** *J Biol Chem* 2001. 276: 18321-18326.
- 381 Kalinski, P., Hilkens, C. M., Sniijders, A., Sniijdwint, F. G. and Kapsenberg, M. L., **IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells.** *J Immunol* 1997. 159: 28-35.
- 382 Huang, J. T., Welch, J. S., Ricote, M., Binder, C. J., Willson, T. M., Kelly, C., Witztum, J. L., Funk, C. D., Conrad, D. and Glass, C. K., **Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase.** *Nature* 1999. 400: 378-382.
- 383 von Knethen, A., Soller, M. and Brune, B., **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) and sepsis.** *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2007.
- 384 Masoudi, F. A., Inzucchi, S. E., Wang, Y., Havranek, E. P., Foody, J. M. and Krumholz, H. M., **Thiazolidinediones, metformin, and outcomes in older patients with diabetes and heart failure: an observational study.** *Circulation* 2005. 111: 583-590.
- 385 Astarie-Dequeker, C., N'Diaye, E. N., Le Cabec, V., Rittig, M. G., Prandi, J. and Maridonneau-Parini, I., **The mannose receptor mediates uptake of pathogenic and nonpathogenic mycobacteria and bypasses bactericidal responses in human macrophages.** *Infect Immun* 1999. 67: 469-477.
- 386 Lee, S. J., Zheng, N. Y., Clavijo, M. and Nussenzweig, M. C., **Normal host defense during systemic candidiasis in mannose receptor-deficient mice.** *Infect Immun* 2003. 71: 437-445.
- 387 Montaner, L. J., da Silva, R. P., Sun, J., Sutterwala, S., Hollinshead, M., Vaux, D. and Gordon, S., **Type 1 and type 2 cytokine regulation of macrophage endocytosis: differential activation by IL-4/IL-13 as opposed to IFN-gamma or IL-10.** *J Immunol* 1999. 162: 4606-4613.
- 388 Berton, G. and Gordon, S., **Modulation of macrophage mannosyl-specific receptors by cultivation on immobilized zymosan. Effects on superoxide-anion release and phagocytosis.** *Immunology* 1983. 49: 705-715.
- 389 Willment, J. A., Lin, H. H., Reid, D. M., Taylor, P. R., Williams, D. L., Wong, S. Y., Gordon, S. and Brown, G. D., **Dectin-1 expression and function are enhanced on alternatively activated and GM-CSF-treated macrophages and are negatively regulated by IL-10, dexamethasone, and lipopolysaccharide.** *J Immunol* 2003. 171: 4569-4573.
- 390 Cambi, A., Gijzen, K., de Vries, J. M., Torensma, R., Joosten, B., Adema, G. J., Netea, M. G., Kullberg, B. J., Romani, L. and Figdor, C. G., **The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells.** *Eur J Immunol* 2003. 33: 532-538.
- 391 Tailleux, L., Pham-Thi, N., Bergeron-Lafaurie, A., Herrmann, J. L., Charles, P., Schwartz, O., Scheinmann, P., Lagrange, P. H., de Blic, J., Tazi, A., Gicquel, B. and Neyrolles, O., **DC-SIGN induction in alveolar macrophages defines privileged target host cells for mycobacteria in patients with tuberculosis.** *PLoS Med* 2005. 2: e381.
- 392 Miard, S. and Fajas, L., **Atypical transcriptional regulators and cofactors of PPARgamma.** *Int J Obes (Lond)* 2005. 29 Suppl 1: S10-12.
- 393 Annicotte, J. S., Iankova, I., Miard, S., Fritz, V., Sarruf, D., Abella, A., Berthe, M. L., Noel, D., Pillon, A., Iborra, F., Dubus, P., Maudelonde, T., Culine, S. and Fajas, L., **Peroxisome proliferator-activated receptor gamma regulates E-cadherin expression and inhibits growth and invasion of prostate cancer.** *Mol Cell Biol* 2006. 26: 7561-7574.