



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*

Discipline ou spécialité : *Immunologie et Maladies infectieuses*

Présentée et soutenue par Sarah WALACHOWSKI

Le 17 juin 2016

Titre : Etude des propriétés immunostimulantes de composés pariétaux de levure sur les macrophages murins et évaluation dans des modèles infectieux

JURY

M. Eric GHIGO	Directeur de recherche, CNRS, Marseille	Rapporteur
M. Thierry JOUAULT	Chargé de recherche, Inserm, Lille	Rapporteur
Mme Jessica QUINTIN	Chargée de recherche, Institut Pasteur, Paris	Membre du Jury
M. Gilles FOUCRAS	Professeur, DVM, PhD, ENVT, Toulouse	Membre du Jury
M. François MEURENS	Professeur, DVM, PhD, Oniris, Nantes	Membre du Jury

Ecole doctorale : Sciences Economiques, Vétérinaires, Agronomique, Bioingénieries (SEVAB)

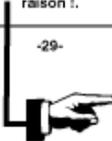
Unité de recherche : ENVT-INRA UMR1225 IHAP

Directeur(s) de Thèse : Gilles FOUCRAS

DEPART

Laisser de côté sa santé mentale avant de commencer.

LE JEU DE LA THESE.

-1- Votre directeur de thèse vous donne le sujet de la thèse, avancez de 3 cases.	-2- 	-3- Vous êtes plein d'enthousiasme, rejouez.	-4- Vous réalisez que le directeur de thèse ne vous a donné rien d'autre que le titre.	-5- Bibliothèque universitaire : vous ne comprenez pas le système de classement, perdez un tour.	-6- Les références les plus importantes sont en japonais ou russe, reculez de 2 cases.	-7- 
-14- 	-13- Vous n'avez pas de chance, et commencez à vous désillusionner, passez 1 tour.	-12- Fin de la première année. 	-11- Les membres du labo ne sont pas du tout impressionnés par vos résultats, passez 1 tour.	-10- Vous faites une préparation extra pour la présentation des résultats de la 1ère année, rejouez.	-9- Vous utilisez du pastis pour soudoyer les techniciens, avancez de 2 cases	-8- Vous avez besoin de votre directeur de thèse, perdez un tour à le trouver.
-15- Vous commencez à déprimer, passez 1 tour.	-16- Vous êtes encore plus déprimé, passez 3 tours.	-17- Vous changez de sujet, retournez en arrière pour tout recommencer.	-18- Vous changez de directeur de thèse, avancez de 6 cases.	-19- Vous prenez quelques contrats en marge de la thèse pour vous faire un peu d'argent, avancez de 2 cases.	-20- 	-21- Les contrats vous prennent trop de temps, reculez de 4 cases.
-28- Vous commencez à penser que vous ne finirez jamais, et vous avez probablement raison !	-27- L'esprit du pastis a frappé, passez 2 tours pour vous en remettre.	-26- Vous travaillez tous les week-end pendant deux mois, avancez de 6 cases.	-25- Fin de la deuxième année. Pas de résultat, qui s'en soucie ?, avancez d'1 case.	-24- Les expérimentations sont en cours, avancez de 4 cases.	-23- Vos échantillons sont mal étiquetés, retournez sur la case 20.	-22- 
-29- 	-30- Vous perdez plus de temps à vous plaindre qu'à travailler, passez 1 tour.	-31- Vous réalisez que votre fiancé(e) gagne 3 fois plus que votre bourse, poussez un grand cri !	-32- Vous vous demandez pourquoi vous avez fait une thèse?, perdez 1 tour pour trouver une réponse.	-33- On vous offre un job, vous pouvez continuer ou vous retirer du jeu.	-34- Vous commencez à rédiger, maintenant vous êtes vraiment déprimé, passez 5 tours.	-35- 
-42- Félicitations, vous avez soutenu votre thèse, allez directement à l'ANPE.	-41- On vous demande de ressoumettre votre thèse, allez à la case 32.	-40- Vous décidez que la thèse n'en vaut pas la peine, vous abandonnez, fin de la partie.	-39- Votre thèse a été désapprouvé par un rapporteur externe, allez à la case 28.	-38- Après 6 mois de rédaction, de nouvelles analyses arrivent,retournez à la case 34.	-37- Disque dur grillé!, passez 2 tours pour retrouver les sauvegardes sinon retournez à la case 34.	-36- Vos résultats viennent juste d'être publiés par un confrère, allez à la case 28.

REMERCIEMENTS

Une thèse est une longue épopée enrichissante, parsemée de surprises, tantôt de réussites (ouf !), tantôt d'échecs mais surtout de rencontres, se terminant par une grande rétrospective du travail accompli : la rédaction. Les remerciements en sont le clou, adressés à toutes les personnes qui ont contribué à la construction de cet édifice. Mais est-il plus facile d'écrire les remerciements que le contenu principal du manuscrit ? Pas si sûr...

Tout d'abord, j'adresse mes sincères remerciements à l'ensemble des membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'y siéger et d'examiner mon travail à la lumière de leur expertise.

Je tiens à exprimer ma plus haute considération à

Monsieur le Docteur Eric Ghigo

qui a accepté de juger cette thèse en qualité de rapporteur. Je le remercie pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail et lui suis reconnaissante d'avoir pu bénéficier de ses conseils qui ont contribué à améliorer ce manuscrit.

Monsieur le Docteur Thierry Jouault

pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je lui adresse mes sincères remerciements ainsi que ma profonde gratitude pour la considération qu'il a eu à l'égard de mes travaux ainsi que pour ses précieux conseils qui m'ont permis d'enrichir ce manuscrit.

Madame le Docteur Jessica Quintin

qui me fait l'honneur de siéger à ce jury de soutenance de thèse. Je lui témoigne mon plus profond respect pour la confiance et l'expertise dont elle m'a fait bénéficier.

Monsieur le Professeur François Meurens

pour sa participation au jury de cette soutenance. Qu'il soit assuré de ma profonde reconnaissance et de tous mes remerciements pour la disponibilité et l'enthousiasme dont il a fait preuve.

A l'ensemble des membres de notre partenaire industriel **Lesaffre-Philéo Animal Care, Christine Julien, Jean-Philippe Marden et Eric Auclair**

pour la confiance qu'ils m'ont accordé en acceptant ma candidature et en prolongeant le contrat initialement mis en place avec l'équipe. Ils m'ont ainsi donné l'opportunité de

terminer mon mémoire dans des conditions plus qu'optimales. Si parfois les objectifs de travail et les points de vue différaient, c'était un immense honneur et une véritable richesse d'apporter ma contribution à la caractérisation de leurs extraits de paroi de levure. Je leur témoigne mon plus profond respect pour leur implication dans le bon déroulement de ma thèse.

A l'ensemble de l'équipe 'Pharmacology, Toxicology and Biochemistry' du Laboratoire de 'Biochemistry' de la faculté de médecine vétérinaire de l'université de Gent (Belgique), notamment aux **docteurs Koen Breyne** et **Kristel Demeyere** ainsi qu'à la **professeure Evelyne Meyer**

pour m'avoir si chaleureusement accueillie et pour m'avoir permis de réaliser mon séjour de validation du parcours EIR-Agreenium au sein de leur structure. Ils se sont assuré que mon séjour soit des plus agréables, un grand merci pour m'avoir formée et conseillée sur la technique d'inoculation intra-mammaire en modèle murin et d'avoir partagé avec moi les outils et les connaissances dans ce domaine.

au Docteur Guillaume Tabouret

pour sa collaboration et sans qui mon travail n'aurait pas le même cachet. Je tiens particulièrement à le remercier pour son soutien quotidien, son implication dans ce projet, ses conseils avisés ainsi que la pédagogie dont il a fait preuve au cours de ces 3 années de thèse riche en rebondissements. Il m'a non seulement communiqué son sang-froid dans les moments les plus critiques des expérimentations mais aussi sa curiosité et son goût pour le questionnement scientifique. Son aide et son expertise des plus précieuses m'ont permis de mener à bien ce travail et de développer bon nombre de mes réflexions. Toutes ces raisons me poussent à lui exprimer mes plus chaleureuses pensées.

Et puisqu'une thèse sans un directeur ne pourrait exister, c'est avec ma plus belle plume que je tiens à adresser mon extrême reconnaissance et mes plus sincères remerciements au **Professeur Gilles Foucras**. Pour sa confiance aveugle, son dévouement, son important soutien et sa patience exemplaire durant ces trois années de thèse, je lui exprime ma plus profonde gratitude. Il a su m'accueillir à bras ouverts dans son équipe et me transmettre les bases de la recherche en laboratoire, ce qui représente une réelle prise de risque pour un encadrant. Je ne saurais le remercier assez pour cela ainsi que pour l'autonomie qu'il m'a accordée sans doute. Ses remarques pertinentes et suggestions m'ont assurément apporté une vision de la recherche riche en perspicacité. Son optimisme et son énergie positive ont

définitivement marqué ma thèse tout comme le plaisir que j'ai eu à travailler au sein de cette équipe.

J'en profite pour remercier chaleureusement les techniciens **Christian Tasca** et **Cécile Caubet** pour leur écoute, leur aide et leurs conseils pratiques qu'ils n'ont pas hésité à me prodiguer lorsque j'en avais besoin. Par ailleurs, je n'oublie pas les moments de convivialité passés en leur compagnie notamment lors des micro-pauses café.

Je souhaite également encenser **Théophile Denoeud** pour ses talents d'informaticien, la qualité de son travail et surtout pour l'aide précieuse qu'il m'a apporté à de nombreuses reprises. Je salue sa générosité qui l'a poussé à voler à mon secours lors de ces moments de détresse informatique. Un grand merci pour sa chaleur humaine et sa sympathie, qualités qui doivent probablement provenir de nos origines communes. Il me reste aujourd'hui une belle amitié.

Je terminerais enfin ce tour d'honneur académique en remerciant les différents collègues de recherche et les personnels scientifiques rencontrés au fil de ma thèse, qu'ils soient locaux ou non, et qui ont contribué de près ou de loin à l'élaboration de cette thèse. Je ne prendrais pas le risque de vouloir les citer de peur d'en oublier.

Et puisqu'il existe une vie en dehors du labo (Si Si !), je voudrais remercier toutes les personnes qui gravitent autour de ma vaste sphère avec une pensée spéciale pour mon gentleman dancier « Sogéclairien » qui a su me booster à toutes les étapes de ce voyage enrichissant. Tous sans exception m'ont permis d'évacuer la pression, de relativiser et d'oublier les tracasseries quotidiennes d'un PhD.

Je finirais par dire un immense merci à mon entourage et ma famille pour qui les choix d'études peuvent être difficiles, surtout lorsqu'il s'agit de greffer encore et toujours des années supplémentaires. J'ai la chance d'avoir des parents qui m'ont toujours soutenu (et supporté) dans mes choix d'études. Je leur dédie donc ce manuscrit et leur témoigne toute ma gratitude au terme de cette ultime étape. Cette thèse s'achève donc sur ces derniers mots, aux portes d'une nouvelle aventure.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
INTRODUCTION GENERALE.....	14
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	18
I.1 INTRODUCTION A L'IMMUNITE.....	20
I.2 LE MACROPHAGE ET SON ROLE DANS L'IMMUNITE	24
<i>I.2.1 Origine, morphologie et distribution tissulaire</i>	<i>24</i>
<i>I.2.2 Rôle du macrophage dans l'immunité innée</i>	<i>29</i>
I.2.2.1 Reconnaissance des molécules étrangères	29
I.2.2.1.1 Le système du complément	30
I.2.2.1.2 Les PRR (Pattern Recognition Receptors)	33
I.2.2.1.3 Les adhésines	44
I.2.2.1.4 Les autres molécules de surface.....	45
I.2.2.2 Phagocytose	46
I.2.2.2.1 Définition et rôle	46
I.2.2.2.2 Voies d'activation et étapes clés	46
I.2.2.2.3 L'explosion respiratoire ou « burst oxydatif »	50
I.2.2.3 Réponse inflammatoire et chimiotactisme.....	51
I.2.2.3.1 Caractéristiques de l'inflammation	51
I.2.2.3.2 Synthèse de cytokines et chimiokines	52
I.2.2.3.3 Production de médiateurs lipidiques	56
I.2.2.4 Recrutement leucocytaire	57
I.2.2.4.1 Granulocytes neutrophiles	59
I.2.2.4.2 Monocytes.....	62
I.2.2.5 Régulation de l'inflammation et retour à l'homéostasie	64
I.2.2.6 Les différents phénotypes d'activation du macrophage	67
<i>I.2.3 Rôle dans l'immunité acquise</i>	<i>70</i>
I.2.3.1 Cellules présentatrices d'antigènes	70
I.2.3.2 Activation des lymphocytes T	71
I.3 LES BETA-GLUCANES ET STRUCTURE DE LA PAROI DE LEVURE	74
<i>I.3.1 La paroi des levures, structure et fonction.....</i>	<i>74</i>
<i>I.3.2 Les bêta-glucanes, sources et structures associées</i>	<i>77</i>
<i>I.3.3 Les autres composants de la paroi de Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>81</i>
I.3.3.1 La chitine	81
I.3.3.2 Les mannoprotéines	83
I.3.3.3 Les glycolipides	85
<i>I.3.4 Méthodes d'extraction des BG.....</i>	<i>85</i>
<i>I.3.5 Activités biologiques des BG et intérêts pour la santé.....</i>	<i>87</i>
I.3.5.1 Importance des BG dans le traitement des cancers	88
I.3.5.2 Rôle des BG dans le traitement de l'hypercholestérolémie, du diabète, de l'hypertension et la cicatrisation	90
I.3.5.2.1 Hypercholestérolémie	90
I.3.5.2.2 Hyperglycémie/Diabète	90
I.3.5.2.3 Hypertension artérielle	91
I.3.5.2.4 Le processus de cicatrisation.....	92
I.3.5.2.5 Action anti-oxydante des BG	92
I.3.5.2.6 Les applications prébiotiques des BG	92
I.3.5.3 Importance des BG dans le traitement des maladies infectieuses	93
I.3.5.3.1 L'activité antivirale des BG fongiques.....	93
I.3.5.3.2 L'activité antifongique des BG fongiques	94
I.3.5.3.3 L'activité antibactérienne des BG fongiques	95
I.4 INTERACTION SPECIFIQUE DES BG ET AUTRES COMPOSANTS DE LA PAROI DE LEVURE AVEC LE MACROPHAGE	96
<i>I.4.1 Les récepteurs et voies de signalisation impliqués dans la reconnaissance des BG</i>	<i>97</i>
I.4.1.1 CR3, Lactosylcéramide et récepteurs Scavenger	98
I.4.1.1.1 Le récepteur du complément récepteur CR3	98
I.4.1.1.2 Le Lactosylcéramide (LacCer)	100

I.4.1.1.3 Les récepteurs Scavenger (SR).....	101
I.4.1.2 Dectin-1	102
I.4.1.2.1 Structure moléculaire du récepteur	102
I.4.1.2.2 Distribution et régulation de l'expression de Dectin-1.....	105
I.4.1.2.3 Voie de signalisation associée à Dectin-1.....	107
I.4.1.2.3.1 Signaux dépendant de Syk	108
I.4.1.2.3.1.1 Activations Classique et Alternative de NFκB et autres facteurs de transcription.....	108
I.4.1.2.3.1.2 Production des ROS	109
I.4.1.2.3.1.3 Induction de l'inflammasome	110
I.4.1.2.3.1.4 Initiation de l'immunité adaptative	111
I.4.1.2.3.2 Voie de signalisation indépendante de Syk (ou voie de signalisation Raf-1-dépendante)	112
I.4.1.2.3.2.1 L'activation de NFκB via Raf-1.....	112
I.4.1.2.3.2.2 La phagocytose	112
I.4.1.2.4 Relation structure/activité entre les β(1,3)-glucanes et Dectin-1	113
I.4.2 La reconnaissance des autres composants de la paroi de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	114
I.4.2.1 TLRs.....	115
I.4.2.2 MR	117
I.4.2.3 Autres Lectines	117
I.4.3 Coopération entre PRRs et reconnaissance des extraits de parois de levure.....	120
I.4.3.1 Coopération entre Dectin-1 et les TLRs	120
I.4.3.2 Coopération entre Dectin-1 et les autres PRRs	122
I.4.3.3 Coopération entre Dectin-1 et certaines protéines transmembranaires	124
I.4.4 Les stratégies d'échappement à l'immunité	124
CHAPITRE II : RESULTATS DES TRAVAUX DE RECHERCHE	128
II.1 ANALYSE DES EFFETS DES BG SUR LES MACROPHAGES MURINS IN VITRO	132
II.1.1 Contexte et objectifs	132
II.1.2 Résumé	134
II.1.3 Article 1.....	137
II.1.4 Résultats supplémentaires.....	170
II.1.4.1 La source et la structure des BG et d'autres composés pariétaux influencent l'intensité de la réponse inflammatoire des macrophages.....	170
II.1.4.2 Influence de la fragmentation des composés pariétaux de levure sur la réponse cellulaire des macrophages	173
II.1.4.3 La réponse des macrophages dérivés de monocytes sanguins bovins ont une réponse cytokinique similaire à celles des macrophages murins	176
II.1.4.4 Les extraits enrichis en BG favorisent un phénotype correspondant à l'activation alternative du macrophage et différent de celui des extraits bruts de <i>Sc CW</i>	178
II.1.4.5 L'injection intra-péritonéale des extraits de <i>Sc CW</i> chez la souris induit une réponse d'intensité et de cinétique variable selon le degré d'enrichissement en BG.....	181
II.2 . ANALYSE DU PRETRAITEMENT DES BG SUR LES MACROPHAGES MURINS EN CONDITIONS INFECTIEUSES.....	188
II.2.1 Contexte et objectifs	188
II.2.2 Résumé	189
II.2.3 Article 2.....	190
II.2.4 Résultats supplémentaires.....	242
II.2.4.1 Le pré-traitement des macrophages bovins avec des extraits enrichis en BG amplifie leur réponse au LPS	242
II.2.4.2 Le profil d'expression des gènes montre que les extraits enrichis en BG amplifient la réponse inflammatoire induite par l'exposition à un ligand TLR.....	245
II.3 . ADMINISTRATION DES BG A LA SOURIS ET EFFETS SUR LA REPOSE A L'INFECTION	250
II.3.1 Contexte et objectifs	250
II.3.2 Article 3.....	251
CHAPITRE III : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES	286
ANNEXES	304
BIBLIOGRAPHIE.....	310

ABREVIATIONS

7AAD: 7-Aminoactinomycin D

AA: Acide Arachidonique

Ag: Antigène

AMPc: Adenosine 3', 5' monophosphate cyclique

APC: Antigen Presentating Cells ou Cellules Présentatrices d'Antigènes (professionnelles)

BG: β -glucanes

BMDM: Bone Marrow-Derived Macrophage

boMDM: Macrophages différenciés à partir de monocytes sanguins bovins

C.albicans: *Candida albicans*

CARD9: Caspase recruitment domain9

CFU: Colony Forming Unit

CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité

COX2 ou Ptgs2: Cyclo-oxygenase 2

CR3: Complement Receptor 3

CRD: Carbohydrate Recognition Domain

CREB: C-AMP Response Element-binding protein

Curd: Curdlan

CW: Cell Wall (paroi)

DC: Dendritic cells ou cellules dendritiques

DC-SIGN: Dendritic Cell-Specific ICAM (intercellular adhesion molecule)-Grabbing

Nonintegrin

DD: Degré de déacétylation

DO (OD en anglais): Densité Optique

DPBS: Dulbecco's phosphate buffered saline

Ec: *Escherichia coli*

EDTA: Ethylène diamine tétra acétique

FC: Fold Change

FCS: Fetal Calf Serum

FHL2: Four and a half LIM domains 2

GM-CSF ou CSF-2: Granulocyte Macrophage-colony stimulating factor

GR-1: Granulocyte antigen-1

IFN- γ : Interferon- γ

IL: Interleukine

iNOS: Inducible nitric oxide synthase (ou NOS2)

i.p.: Intra-péritonéal

IPA: Ingenuity Pathway Analysis software

IRAK: IL-1 receptor-associated kinase

IRF-4: IFN regulatory factor 4

ITAM: Immuno-receptor Tyrosine-based Activation Motif

Jak: Janus kinases

KO: Kock-Out

LPS: Lipopolysaccharide

LTA: Acide Lipoteichoïque

LT: Leucotriène

L_T: Lymphocytes T

LX: Lipoxine

MAP kinases (MAPKs): Mitogen-Activated Protein kinases

MARKS: Myristoylated, Alanine-Rich C Kinase Substrate

M-CSF ou CSF-1: Macrophage-colony stimulating factor

MDP: Muramyl Dipeptide

MyD88: Myeloid differentiation factor 88

MOI: Multiplicity of Infection

MR: Mannose Receptor

NADPH oxidase: Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase

NEAA: Non-essential amino acids

NF κ B: Nuclear Factor- κ B

NLRs: NOD-like receptors

NLRP3: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3

NOD: Nucleotide-binding Oligomerization Domain

p.i.: post-infection

Pam3: Pam3CSK4 (TLR1/2ligand)

PAMPs: Pathogen associated molecular patterns

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells

PBS: Phosphate Buffered saline

Pen-Strep: penicillin-streptomycin

PG: Prostaglandine

PI: Propidium Iodide

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase

PLA2: Phospholipase A2

PLC γ : Phospholipase C γ

PLM: Phospholipomannane

PMN: Polymorphonuclear Neutrophil

PPAR: Peroxisome Proliferator-Activated Receptor

PRRs: Pattern-recognition receptors

ROS: Reactive oxygen species

RPM: Resident Peritoneal Macrophage (Macrophage péritonéal résident)

RPMI: Roswell parl memorial institute medium

Sa: Staphylococcus aureus

Sc: Saccharomyces cerevisiae

SEAP: Secreted embryonic alkaline phosphatase

SIGNR3: Specific ICAM-3-grabbing nonintegrin-related-3

SOCS: Suppressor of cytokines signaling

SR: Scavenger receptor

STAT: Signal transducer and activator of transcription

Syk: Spleen tyrosine kinase

TEPM: Thioglycollate-Elicited Peritoneal Macrophage (Macrophage péritonéal recruté par injection de thioglycollate)

TGF- β : Transforming growth factor- β

Th: T helper ou T auxiliaire

TIR: Toll/IL-1 receptor

TLRs: Récepteurs Toll-like

TNF α : Tumor Necrosis Factor- α

TRAF: TNF receptor associated protein

TX: Thromboxane

WGPd ou WGPs: Wellmune WGP dispersible ou soluble

WT: Wild Type

YCW: Yeast Cell Wall (paroi de levure)

Zym: Zymosan

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Légende des figures

Figure I-1: Les principaux mécanismes de l'immunité innée et adaptative [8].	20
Figure I-2: Les épithéliums et leurs fonctions dans l'immunité innée [8].	22
Figure I-3: Les principales cellules de la réponse immunitaire et leurs fonctions [8].	23
Figure I-4: Le système des phagocytes mononucléés [16].	24
Figure I-5: Morphologie et maturation des phagocytes mononucléaires [8].	26
Figure I-6: Le système du complément et son activation [8].	31
Figure I-7: Le réseau du système du complément et son implication dans les processus cellulaires [41].	32
Figure I-8: Les voies de signalisation des TLRs [50].	37
Figure I-9: La collaboration entre les différents TLRs [61].	39
Figure I-10: Représentation structurale des CLR [78].	40
Figure I-11: Les CLR transmembranaires et leurs voies de signalisation intracellulaires [77].	41
Figure I-12: La collaboration NOD/TLRs [61].	43
Figure I-13: Les étapes clé de la phagocytose [105].	48
Figure I-14: Les facteurs microbicides du phagocyte professionnel [115].	51
Figure I-15: Les cytokines/chimiokines et leur différents rôles dans la réponse inflammatoire [126].	53
Figure I-16: Les voies de métabolisme de l'acide arachidonique (d'après [128]).	56
Figure I-17: Cascade des événements de la migration des leucocytes circulants vers les foyers infectieux [8].	58
Figure I-18: La diversité des molécules antimicrobiennes produites par les neutrophiles [140].	60
Figure I-19: Les fonctions du neutrophile [138].	61
Figure I-20 : Vue intégrée du partenariat Neutrophiles/Monocytes lors de l'inflammation [143].	64
Figure I-21: Les interactions phagocytaires lors de la résolution de l'inflammation [145].	65
Figure I-22: Les médiateurs lipidiques et leur rôle dans l'inflammation [148].	66
Figure I-23: Le spectre d'activation des macrophages [151].	68
Figure I-24: Les propriétés fonctionnelles et les inducteurs des différents phénotypes d'activation du macrophage. D'après [33].	69
Figure I-25: Lien entre immunité innée et immunité adaptative [8].	71
Figure I-26: L'organisation structurale de la paroi de levure. Adapté de [177].	75
Figure I-27: Représentation schématique de l'architecture des constituants de la paroi de <i>Sc</i> [180].	76
Figure I-28: La diversité des branchements au sein des $\beta(1,3)(1,6)$ -glucanes [6].	78
Figure I-29: Structure chimique de la chitine [181].	81
Figure I-30: Les relations des mannoprotéines avec les autres composants de la paroi de <i>S. cerevisiae</i> [174].	83
Figure I-31: Les voies de signalisation possiblement médiées par les récepteurs des BG fongiques [6].	98
Figure I-32: La structure de Dectin-1, d'après [76].	103
Figure I-33: Les isoformes résultant de l'épissage alternatif du récepteur Dectin-1 humain [317].	104

Figure I-34: Localisation des cellules exprimant Dectin-1 aux portes d'entrée des agents pathogènes [82].	106
Figure I-35: La reconnaissance des BG particulières et solubles par Dectin-1 et les signaux de transduction associés dans le macrophage et la cellule dendritique [342].	111
Figure I-36: Les voies de signalisation des récepteurs impliqués dans la reconnaissance des composants des parois fongiques [378].	119
Figure I-37: La collaboration entre Dectin-1 et les TLRs [61].	121
Figure I-38: La coopération des PRRs lors de la reconnaissance de <i>C. albicans</i> par les APCs [177].	123
Figure I-39: La morphologie des champignons et son influence sur la capacité de Dectin-1 à reconnaître les BG [309].	126
Figure II-1	171
Figure II-2	174
Figure II-3	177
Figure II-4	178
Figure II-5	182
Figure II-6	243
Figure II-7	245

Légende des tableaux

Tableau I-1: Diversité et fonctions des macrophages selon leur localisation [17].	28
Tableau I-2: Les principales alarmines et leurs propriétés fonctionnelles [43].	33
Tableau I-3: La détection des PAMPs par les TLRs et autres PRRs [44].	34
Tableau I-4: Les différents récepteurs impliqués dans la phagocytose [105].	47
Tableau I-5: La diversité d'action des cytokines [117].	54
Tableau I-6: Les différentes sous-populations de monocytes sanguins [136].	63
Tableau I-7: Les macromolécules de la paroi de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> [178].	76
Tableau I-8: Exemple de β -glucanes et leur diversité moléculaire [6].	80
Tableau I-9: Effets des différents procédés d'extraction sur la pureté et le rendement en BG [188].	86
Tableau I-10: Nature, rôle et effets des récepteurs de BG [6].	98
Tableau I-11: Les différents PAMPs de la paroi des champignons et leurs récepteurs [176].	115

INTRODUCTION GENERALE

Depuis quelques années, force est de constater qu'il existe une demande croissante pour limiter les intrants médicamenteux dans les filières d'élevages, toutes espèces animales confondues. Cette demande formulée tant par le consommateur que par le législateur répond au souhait de produire de façon plus respectueuse du bien-être animal et de consommer des aliments de la meilleure qualité hygiénique et organoleptique possible. A l'échéance de 5 ans (Plan Ecoantibio, 2012), la réduction souhaitée de l'utilisation des intrants médicamenteux et en particulier des antibiotiques dans les filières avoisine 25%, voire 50% dans certains pays européens. De plus, cet objectif doit être atteint sans baisse de productivité et ni de rentabilité des élevages, dans un contexte où la demande globale en matières premières agricoles et en produits transformés ne cesse d'augmenter en raison d'un accroissement régulier de la population mondiale, de son niveau de vie et de l'évolution des besoins et des habitudes alimentaires. A cet effet, le maintien de la production parallèlement à la réduction maximale du recours aux intrants médicamenteux dans les élevages représentent de véritables enjeux sanitaires, sociétaux et économiques majeurs.

Cette limitation de l'utilisation des antibiotiques dans les filières de production animale présente trois objectifs majeurs et essentiels pour assurer la pérennité des systèmes d'élevage : limiter l'émergence de nouveaux agents pathogènes résistants aux antibiotiques communément utilisés pour le traitement des infections chez l'homme et ainsi maintenir intacts les moyens thérapeutiques utilisés exclusivement chez l'homme, et maintenir voire améliorer la sécurité sanitaire des produits animaux.

Dans ce contexte, il devient donc urgent de développer des méthodes alternatives à l'utilisation des antibiotiques permettant de lutter efficacement contre les agents infectieux présents dans les élevages. A titre d'exemple, les élevages laitiers font face de façon récurrente et parfois de façon chronique à des infections localisées du tissu mammaire (encore appelées mammites) en période de production, et ce malgré l'augmentation des mesures hygiéniques et préventives. La sélection d'animaux à capacité de production élevée a peut-être contribué à l'augmentation de leur fréquence. Ces infections sont largement causées par la colonisation de la glande à travers le canal du trayon par des germes banals, ce qui provoque une réaction inflammatoire d'intensité forte à modérée, rendant le lait impropre à la consommation et conduisant parfois à la mort de l'animal. En termes de fréquence et d'impact

économique, les mammites sont considérées comme l'une des principales pathologies affectant les bovins laitiers. A l'heure actuelle, le seul traitement efficace repose sur l'utilisation d'antibiotiques, faisant de cette maladie le principal motif de leur recours en élevage laitier. Le développement de méthodes alternatives à la pharmacopée conventionnelle ne se résume donc pas seulement à un enjeu pour la santé animale mais aussi pour la santé publique. En premier lieu, la stratégie la plus simple à mettre en place consiste à sélectionner des animaux toujours plus résistants génétiquement à ces infections. Cette méthode reste cependant chronophage puisque la sélection génétique est un processus long et rétroactif. La seconde stratégie repose sur la vaccination, qui a fait ses preuves sur un grand nombre de maladies causées par des virus ou des bactéries. Cependant une telle approche n'a à ce jour pas apporté de solution efficace dans les cas de mammites quel que soit l'agent pathogène considéré et la diversité phylogénétique des bactéries responsables étant grande, cela rend difficile la conception d'un vaccin universel. Il existe enfin une autre alternative basée sur une approche ancienne et traditionnellement appliquée en santé humaine dans certaines civilisations mais qui reste marginale en santé animale : la nutraceutique. Cette méthode consiste à améliorer la résistance naturelle et non spécifique des animaux vis-à-vis de nombreux agents infectieux par l'alimentation via des composés réellement dotés de propriétés immunostimulantes. La preuve de ce concept existe d'ailleurs depuis peu, notamment avec la mise sur le marché récente d'immunostimulants injectables à destination des bovins laitiers.

Parallèlement, l'EFSA (Autorité Européenne de sécurité des aliments) a récemment publié un avis favorable sur les β -glucanes (BG) et leurs divers bénéfices pour la santé humaine, notamment leurs effets anti-cholestérol associés à la réduction des maladies cardiovasculaires, et leurs effets positifs dans la lutte contre l'obésité (avis 1924/2006, cf. EFSA NDA Panel, 2010), alors que plus de 80% des molécules réputées et commercialisées pour leurs bénéfices santé ont remporté une opinion négative. La raison principale de ce succès récent repose sur leurs bienfaits reconnus depuis des millénaires par la médecine traditionnelle orientale [1]. Les BG sont notamment connus pour leurs propriétés immuno-modulatrices sur les cellules de l'immunité innée, telles que les macrophages ou encore les cellules dendritiques, et par conséquent pour leurs applications potentielles en thérapeutique. En effet, un large panel de bénéfices pour la santé est attribué aux BG et notamment des effets anti-tumoraux [2,3], anti-diabète, anti-cholestérol [4], vasculaires [5], détoxifiant, mais aussi pour leur activité antimicrobienne aussi bien contre les infections virales, que bactériennes ou fongiques [6].

Compte tenu de leur action positive généralisée sur les maladies les plus courantes, de nombreux additifs alimentaires contenant des BG apparaissent sur le marché et sont de plus en plus utilisés à des fins thérapeutiques. En effet, au Japon ou en Chine, le Lentinan, une préparation contenant des BG provenant du champignon *Lentinus edodes* (ou Shiitake), est reconnu pour améliorer le taux de survie des patients atteints de cancers gastriques et colorectaux [7]. Les BG sont des composés essentiellement présents dans les parois des champignons incluant les levures (champignons unicellulaires) mais peuvent aussi provenir d'autres sources telles que les bactéries ou encore les céréales. De cette grande diversité résulte une hétérogénéité de structure des BG qui est plus ou moins marquée, et qui par conséquent est associée à des réponses cellulaires variables chez l'hôte. De plus, les études précédemment réalisées dans le domaine des BG s'appuient le plus souvent sur des préparations de BG dont la composition et le degré de pureté des BG ne sont pas spécifiés, ce qui rend l'interprétation des résultats périlleuse.

Ce travail de thèse a donc pour vocation de préciser et de caractériser les effets biologiques propres des BG sur les macrophages, historiquement décrits comme les acteurs clés de la réponse immunitaire innée. Il s'agit également d'apporter des connaissances sur les mécanismes moléculaires par lesquels les BG peuvent augmenter le niveau de réactivité de l'hôte face à différents agents pathogènes responsables des infections, en particulier ceux impliqués dans les infections de la glande mammaire des ruminants domestiques.

Ce travail se décline en 4 chapitres successifs :

Le Chapitre 1 décrit le contexte de mes recherches d'après une synthèse bibliographique sur (i) les macrophages, leurs fonctions biologiques et leur rôle de médiateurs situés à l'interface de l'immunité innée et l'immunité spécifique dans un premier temps, (ii) sur les β -glucanes en décrivant leur diversité ; et enfin (iii) sur les interactions spécifiques entre BG et macrophages au cours de la réponse de l'hôte. La grande majorité des études ont été réalisées chez la souris mais il existe une quantité importante de résultats sur d'autres espèces, notamment sur les espèces de rente (porcine mais aussi bien bovine).

L'ensemble des résultats obtenus seront présentés dans le Chapitre 2 selon trois axes. Chaque axe se base sur une approche différente de l'étude des effets immuno-modulateurs des BG, et se divise selon un modèle commun s'appuyant sur un article scientifique rédigé en anglais associé à une courte présentation du travail en français. Cette présentation sommaire de

l'article rappelle brièvement le contexte et les objectifs de l'étude ainsi que les principaux résultats et éléments de la discussion en français.

L'axe 1 se focalise sur la réponse cellulaire directement induite par les BG au travers d'une caractérisation *in vitro* des effets dose, temps d'incubation associés à différents niveaux d'enrichissement en BG de trois composés préparés à partir de la paroi de levure *Saccharomyces cerevisiae*. L'axe 2 présente également les réponses cellulaires *in vitro* des macrophages traités avec des BG mais grâce à une approche visant à évaluer les effets potentiateurs des BG en amont d'une stimulation par des bactéries vivantes ou leurs ligands. L'axe 3 étudie les effets des BG *in vivo* à l'aide d'un modèle murin après injection par voie systémique ou locale ou après administration orale avant une épreuve bactérienne pour évaluer leurs effets immuno-modulateurs. L'ensemble de ces axes a permis de formuler des hypothèses sur les mécanismes d'action des BG sur les macrophages et de déterminer les gènes candidats impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire innée par les BG.

Enfin le Chapitre 4 récapitule l'ensemble des résultats obtenus et les compare aux données déjà disponibles sur l'activité immuno-modulatrice des BG sur les macrophages en conditions infectieuses. Cette discussion est accompagnée de quelques réflexions sur le travail effectué et propose quelques perspectives d'avenir pour la poursuite du projet.

Chapitre I : Revue bibliographique

I.1 Introduction à l'immunité

L'immunité est définie comme l'ensemble des mécanismes de défense d'un organisme contre les éléments étrangers, en particulier les agents infectieux, lui conférant ainsi une résistance aux maladies infectieuses. L'ensemble des tissus, des cellules (en particulier celles désignées sous le nom de leucocytes), et des molécules qui concourent à protéger les individus des infections constituent le système immunitaire. Les mécanismes de défense de l'hôte se composent d'une **immunité innée** (dite aussi **naturelle**), non spécifique et précoce, responsable de la protection initiale contre les infections ; et de **l'immunité acquise**, spécifique et considérée comme plus tardive, qui met en œuvre une réponse dotée d'une forte spécificité pour l'agent pathogène en question (Figure I-1).

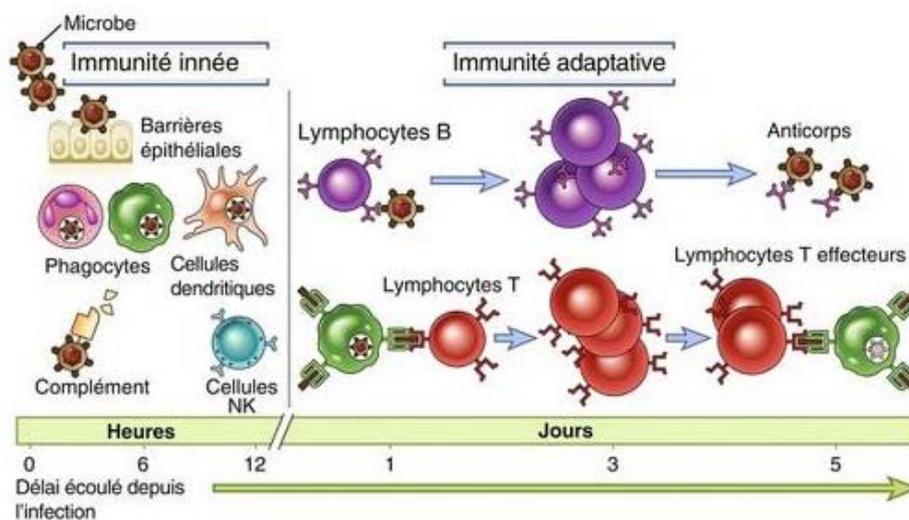


Figure I-1: Les principaux mécanismes de l'immunité innée et adaptative [8].

L'**immunité innée** ou naturelle constitue la première ligne de défense de l'hôte, assurée par des cellules et des molécules qui sont plus ou moins toujours présentes et prêtes à éliminer les agents étrangers par des mécanismes de reconnaissance des microbes (ou de dommages causés aux cellules). Les composants de cette immunité reconnaissent des structures communes partagées par les différentes classes de micro-organismes (bactéries, virus, champignons) présents dans l'environnement mais absents des cellules de l'hôte. Le système inné évolue d'ailleurs constamment afin de ne pas subir les stratégies mises en œuvre par les agents microbiens pour contourner les modalités de reconnaissance par les cellules de l'hôte.

Ceci implique donc que le système immunitaire est capable de faire la distinction entre les cellules de l'organisme, et les éléments étrangers à l'organisme, dont les cellules altérées. L'immunité innée se distingue de l'immunité acquise par le phénomène de mémoire immunitaire. Alors que la première répond de manière assez similaire au cours des contacts successifs avec un microbe, la dernière garde en mémoire des éléments du précédent contact avec ce microbe et s'y adapte pour y répondre plus efficacement grâce à un mécanisme ciblé. En revanche, les deux types d'immunité ne sont pas indépendants puisque les cellules du système inné instruisent les cellules du système spécifique et réciproquement, le système acquis utilise les mécanismes de l'immunité innée pour éliminer les agents pathogènes via des échanges d'informations qui sont bidirectionnels et constants.

Les premières lignes de défense de l'hôte sont matérialisées par les **barrières épithéliales** constituées de la peau et des muqueuses. Ces dernières sécrètent un liquide visqueux, le mucus, qui protège l'épithélium sous-jacent et favorise l'élimination des micro-organismes grâce au flux permanent créé par le battement des cils vibratiles pour l'arbre bronchique par exemple. La déficience dans la production de mucus ou l'inhibition du mouvement ciliaire (ex. mucoviscidose) est à l'origine d'une augmentation de la prolifération bactérienne sur la surface épithéliale. Par ailleurs, l'efficacité protectrice de ce flux peut être complétée par l'activité des cellules spécialisées et des molécules bactéricides naturellement sécrétées par les épithéliums (Figure I-2). Ces derniers sont formés d'une ou plusieurs couches de cellules épithéliales jointives et solidaires les unes des autres grâce à des jonctions serrées et des jonctions adhérentes [9]. Les épithéliums représentent des barrières physiques, chimiques par la production de substances bactéricides et bactériostatiques [10,11] et enfin biologiques par la présence d'une flore commensale à leur surface [11], qui délimitent l'environnement extérieur et le milieu intérieur, limitant au maximum la pénétration des microbes dans l'organisme.

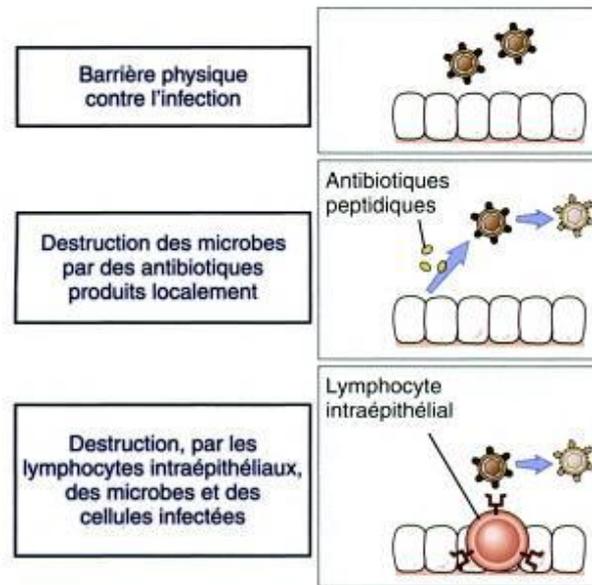


Figure I-2: Les épithéliums et leurs fonctions dans l'immunité innée [8].

Lorsque les micro-organismes parviennent à passer à travers un épithélium, notamment à la suite d'une lésion, ils sont confrontés à la présence des **phagocytes** (macrophages, cellules dendritiques et granulocytes), des protéines plasmatiques comme le **complément**, et par les cellules tueuses ou **cellules NK** (Natural Killer) qui sont des lymphocytes spécialisés dans la veille immunitaire (Figure I-1). A noter que l'ensemble de ces composants de l'immunité innée sont peu capables de détecter des éléments étrangers non infectieux.

L'**immunité adaptative** dispose quant à elle de son propre arsenal défensif, les lymphocytes, seules populations cellulaires à porter des récepteurs spécifiques des antigènes. Les différentes catégories lymphocytaires se distinguent par leurs molécules de surface et remplissent des fonctions complexes et complémentaires, essentielles à l'élimination des agents pathogènes. Les lymphocytes B qui proviennent de la moelle osseuse sont spécialisés dans la production d'anticorps (immunité humorale) tandis que les lymphocytes T provenant du thymus (immunité cellulaire) sont en charge de réguler l'activité effectrice des phagocytes et/ou celles des autres lymphocytes par l'intermédiaire de médiateurs plasmatiques appelés cytokines (fonction des lymphocytes T auxiliaires) et peuvent éliminer les cellules qui servent de réservoir à l'infection (fonction des lymphocytes T cytotoxiques ou CTL).

Le système immunitaire est formé de différentes populations cellulaires dont la morphologie et les fonctions sont détaillées dans la Figure I-3:

- Les lymphocytes ayant pour rôle la reconnaissance spécifique des antigènes,
- des cellules dont la fonction est d'assurer la capture et la présentation d'antigènes microbiens (APC) aux lymphocytes,
- et de cellules effectrices dont font partie, les macrophages et monocytes, les lymphocytes T et les granulocytes (neutrophiles ou PMN et éosinophiles) qui ont pour fonction d'éliminer les agents étrangers, incluant les macrophages et monocytes, les lymphocytes T.

L'orchestration des deux types d'immunité et la communication directe ou indirecte des différents types cellulaires contribuent à une meilleure protection de l'hôte contre les infections d'origine microbienne [12].

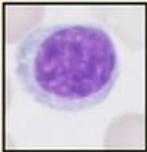
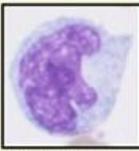
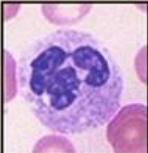
Type cellulaire	Fonctions principales
Lymphocytes : lymphocytes B ; lymphocytes T, cellules NK  <i>Lymphocyte du sang</i>	Reconnaissance spécifique des antigènes : – lymphocytes B : médiateurs de l'immunité humorale – lymphocytes T : médiateurs de l'immunité cellulaire – cellules NK : cellules de l'immunité innée
Cellules présentatrices d'antigène : cellules dendritiques ; macrophages ; cellules dendritiques folliculaires  <i>Cellule dendritique</i>  <i>Monocyte du sang</i>	Capture des antigènes pour la présentation aux lymphocytes : – cellules dendritiques : initiation des réponses assurées par les lymphocytes T – macrophages : phases inductrice et effectrice de l'immunité cellulaire – cellules dendritiques folliculaires : présentent les antigènes aux lymphocytes B lors des réponses immunitaires humorales
Cellules effectrices : lymphocytes T ; macrophages ; granulocytes  <i>Neutrophile</i>	Élimination des antigènes : – lymphocytes T : lymphocytes T auxiliaires et lymphocytes T cytotoxiques – macrophages et monocytes : cellules du système des phagocytes mononucléaires – granulocytes : neutrophiles, éosinophiles

Figure I-3: Les principales cellules de la réponse immunitaire et leurs fonctions [8].

I.2 Le macrophage et son rôle dans l'immunité

I.2.1 Origine, morphologie et distribution tissulaire

Historiquement, les macrophages sont considérés comme les acteurs majeurs de l'immunité innée. En effet, leur première caractérisation en tant que cellules effectrices de la réponse immunitaire et en particulier de la phagocytose remonte aux années 1890 par le « père de l'immunité naturelle », Elie Metchnikoff qui recevra en 1908 le prix Nobel de médecine [13,14]. Plus tard, le macrophage sera considéré comme une cellule résidente des organes ayant pour fonction la prise en charge et l'élimination des agents pathogènes, contribuant ainsi à la première ligne de défense de l'hôte. En 1968, le concept de « système des phagocytes mononucléés » (*Mononuclear phagocyte system* en anglais) présenté en Figure I-4, apparait avec le postulat de Ralph van Furth et Zanvil Cohn, qui fait état de différentes populations de macrophages provenant pour la plupart de la différenciation des monocytes sanguins [15].

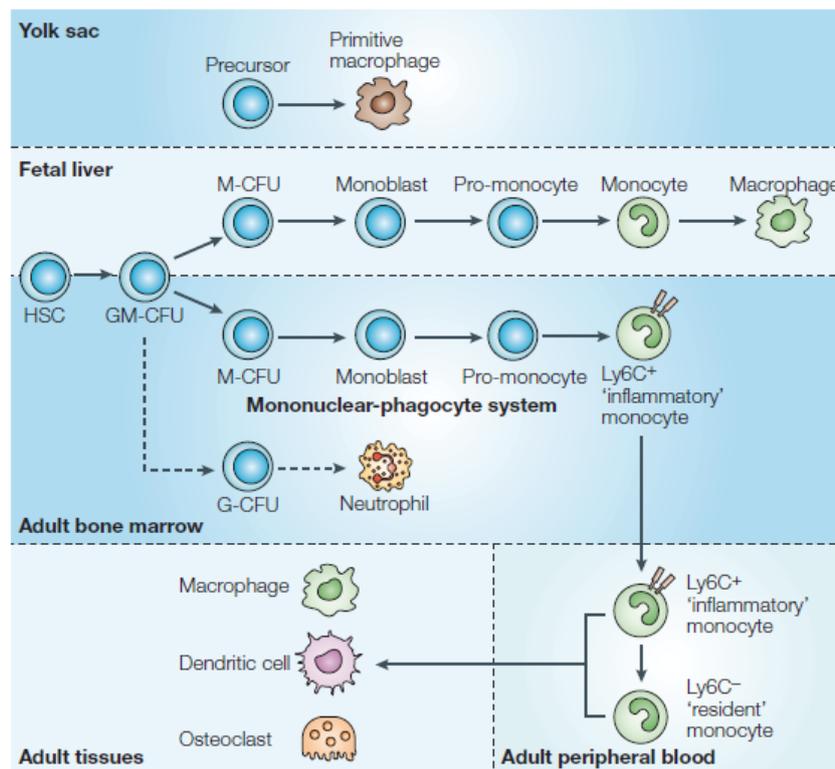


Figure I-4: Le système des phagocytes mononucléés [16].

Les macrophages primitifs sont d'abord stockés dans les sacs embryonnaires. Au cours du développement fœtal, le foie devient le siège de l'hématopoïèse et donc la source de macrophages similaires à ceux présents chez l'adulte, sous l'influence des facteurs de croissance présents dans le milieu. A l'âge adulte, les macrophages résidents des différents tissus proviennent majoritairement de la différenciation des monocytes dérivés de la moelle osseuse. Lors de la libération de ces monocytes (Ly6C⁺) dans le sang périphérique, ils semblent pouvoir évoluer selon deux phénotypes cellulaires exprimant différenciellement Ly6C, d'une part les monocytes dits inflammatoires Ly6C⁺ et d'autre part les monocytes dits résidents Ly6C⁻. HSC: Hematopoietic Stem Cells, GM-CFU: Granulocyte/Macrophage Colony-Forming Unit, M-CFU: Macrophages-Colony-Forming Unit, G-CFU: Granulocyte Colony-Forming Unit.

Ce système comprend plus largement les cellules dendritiques et les cellules progénitrices dont les monocytes sont issus. Initialement, les cellules souches hématopoïétiques se différencient en précurseurs myéloïdes ou lymphoïdes.

Les précurseurs myéloïdes qui sont communs aux granulocytes et aux monocytes [17], se différencient en monocytes sous l'influence du facteur de croissance M-CSF (Macrophage-Colony Stimulating Factor ou CSF-1). Son récepteur CSF-1R est exprimé communément à la surface des monocytes, des cellules dendritiques, des macrophages et des progéniteurs myéloïdes [18]. Une fois différenciés, ces monocytes (et granulocytes) pourront quitter la moelle osseuse et rejoindre la circulation sanguine. Les monocytes du sang représentent 10% des leucocytes circulant chez l'homme et environ 4% chez la souris [18]. Ils forment une population hétérogène de cellules présentant une grande variabilité dans l'expression des marqueurs de surface [16,18,19]. Deux sous populations de monocytes sanguins semblent se distinguer, les monocytes circulants et les monocytes inflammatoires. Les monocytes circulants (Ly6C^{low}) sont impliqués dans la surveillance et migrent en quelques jours vers les tissus non-inflammatoires, où ils se différencient en macrophages résidents ou en cellules dendritiques [20] (les premiers participant à l'homéostasie tissulaire, les dernières étant impliquées dans la réponse spécifique). A l'inverse, les monocytes inflammatoires présentent une durée de vie courte (de quelques heures [20]) et sont rapidement mobilisés dans les sites infectieux et inflammatoires où ils participent à l'élimination des agents pathogènes. Chaque jour, la moitié des monocytes quitte le compartiment sanguin, ils constituent donc le principal réservoir systémique de progéniteurs myéloïdes [19].

Depuis les années 2000, la multiplication des preuves décrivant la grande hétérogénéité des populations de macrophages [21], associée à la subsistance d'incohérences dans le modèle préexistant, poussent les chercheurs à émettre de nouvelles hypothèses quant à l'origine des macrophages. En effet, certains ont observé la prolifération de certains macrophages dans les tissus [22–24], d'autres mettent en évidence la persistance des macrophages localisés dans les tissus [25] ou encore la présence de macrophages dans les sacs embryonnaires de façon primitive à l'hématopoïèse, et susceptibles de persister jusqu'à l'âge adulte [21,26,27]. La discordance entre ces observations avec le système des phagocytes mononuclés pourrait cependant être assimilée à l'existence de cas particuliers. La preuve définitive de la capacité de certains macrophages à survivre durant de longues périodes a cependant été établie par l'étude de Kanitakis [28] montrant que les cellules de Langerhans (macrophages spécialisés de la peau) persistaient pendant plusieurs années chez le receveur après une transplantation.

Plus tard, ce fut au tour de l'équipe de Chorro et al [29] de contribuer à la résolution de cette question en prouvant que les macrophages sont capables de s'auto-renouveler et de proliférer *in situ* pour remplacer les cellules perdues lors d'une inflammation sévère. Ces résultats, ainsi que des observations similaires dans la microglie (encéphale et moelle épinière) [30] permises par le développement de techniques innovantes d'imagerie, ont établi la preuve d'une prolifération *in vivo* des macrophages de différents tissus (cavités péritonéale et pleurale, poumon, cœur, tissu adipeux et rate) répertoriés dans la revue récente de Davies et Taylor [31]. Force est donc de constater que de nombreuses populations de macrophages tissulaires peuvent être renouvelées de façon complètement indépendante du compartiment sanguin à l'état d'équilibre en dehors d'une inflammation [32]. Parallèlement, dans les conditions infectieuses et donc inflammatoires, le recrutement de monocytes semble toujours constituer la source majeure de renouvellement de la population résidente de macrophages tissulaires [16,33]. Les macrophages se différencient des monocytes par leur morphologie adaptée à leurs diverses fonctions. Disséminés dans l'ensemble de l'organisme, les macrophages sont de plus grande taille (entre 25 et 50 μm contre 12 à 15 μm pour les monocytes) et sont dotés d'un système vacuolaire considérablement plus développé comprenant des éléments spécialisés tels que des vésicules d'endocytose, des endosomes, des lysosomes primaires, des phagosomes et des phagolysosomes. La Figure I-5 présente des microphotographies électroniques des deux types cellulaires ainsi que leurs caractéristiques morphologiques.

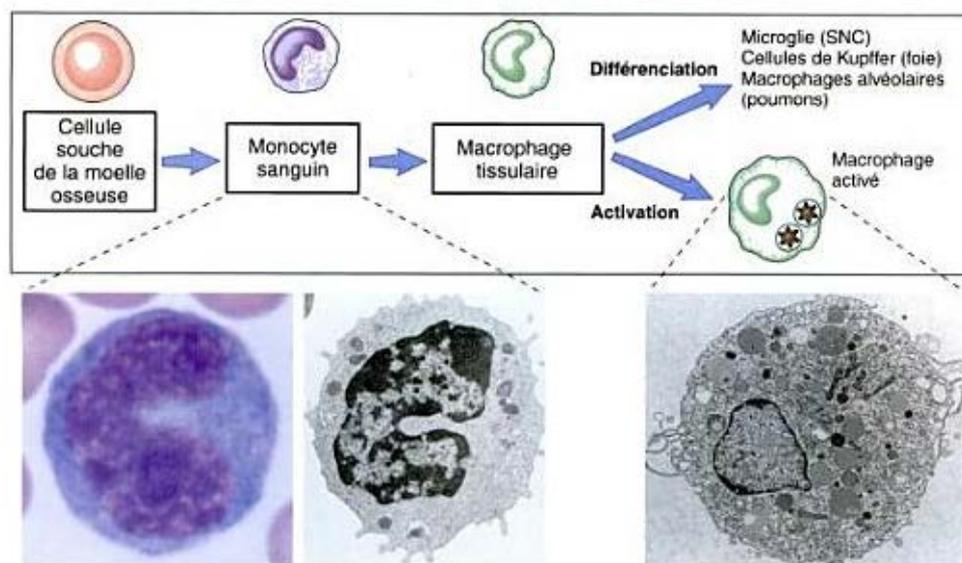


Figure I-5: Morphologie et maturation des phagocytes mononucléaires [8].

Les phagocytes mononucléaires proviennent de précurseurs constitutifs de la moelle osseuse et présentent différents stades. Le stade sanguin est représenté par le monocyte doté de vacuoles et de lysosomes (microphotographies optique et électronique). Les cellules se différencient en macrophages spécialisés résidents dans les tissus sains ou peuvent être directement activés par les microbes. Ils possèdent alors des vacuoles phagocytaires et de nombreux organites cytoplasmiques.

Brièvement, les monocytes comme les macrophages possèdent un noyau en position excentrique rond ou réniforme. Les monocytes ont un ou deux nucléoles qui disparaissent lors de leur différenciation en macrophages. Les deux types cellulaires sont délimités par une membrane ondulée qui entoure un cytoplasme volumineux contenant des vacuoles et diverses granules azurophiles. Pour quitter le compartiment sanguin, les monocytes doivent adhérer à l'endothélium vasculaire via des molécules exprimées à leur surface appelées les adhésines (intégrines et sélectines) qui se lient aux molécules de surface des cellules endothéliales. A la suite de cette interaction, les monocytes peuvent traverser l'endothélium et atteindre les tissus dans lesquels ils peuvent demeurer quelques mois [34].

Les propriétés fondamentales des macrophages sont leur mobilité, leur capacité de phagocytose liée à la fonction de présentation des antigènes et leur pouvoir sécrétoire. Ces fonctions sont assurées notamment grâce aux organelles centrales, à l'appareil de Golgi juxtaposé au noyau ainsi qu'au réticulum endoplasmique rugueux dispersé dans tout le cytoplasme, aux microtubules et microfilaments d'actine très développés permettant leur locomotion et la formation de pseudopodes lors de la phagocytose [35]. Le pouvoir sécrétoire des macrophages est multiple : fractions du complément, cytokines, facteurs hématopoïétiques, radicaux libres, médiateurs lipidiques...

Les macrophages peuvent également être différenciés en fonction de leur état d'activation, l'expression de diverses molécules de surface ainsi d'un large panel de gènes leur confèrent une spécialisation fonctionnelle selon leur localisation dans les différents tissus de l'organisme. La grande hétérogénéité des lignées de macrophages, qui a été décrite à de nombreuses reprises dans la littérature, peut de façon logique être expliquée par la différenciation des cellules résidentes au sein de microenvironnements particuliers [16,21]. En effet, selon la localisation tissulaire, les macrophages résidents portent différentes nominations et exercent des fonctions spécifiques (Tableau I-1). Les macrophages sont omniprésents dans l'organisme : dans le foie (cellules de Kupffer), les organes et tissus lymphoïdes dont la rate, les os (ostéoclastes) et le tissu conjonctif (chondroclastes), les poumons (macrophages alvéolaires et interstitiels), la peau (cellules de Langerhans), les reins (cellules mésangiales), les cavités séreuses (péritoine : macrophages péritonéaux, plèvre : macrophages pleuraux), le tractus gastro-intestinal et uro-génital (cellules de Hofbauer) ainsi que le système nerveux central (microglie, astrocytes) [34,36].

Tissue	Specific macrophage name	Function
Bone	Osteoclast	Bone remodelling and providing a stem cell niche
	Bone marrow macrophage	Erythropoiesis
Brain	Microglial cell	Neuronal survival and connectivity, and repair after injury
Epidermis	Langerhans cell	Immune surveillance
Eye	NA	Vascular remodelling
Intestine	Crypt macrophage	Immune surveillance
Kidney	NA	Ductal development
Liver	Kupffer cell	Clearance of debris from blood and liver tissue regeneration after damage; liver development?
Mammary gland	NA	Branching morphogenesis and ductal development
Ovary	NA	Steroid hormone production and ovulation
Pancreas	NA	Islet development
Testis	NA	Steroid hormone production; Leydig-cell development?
Uterus	Uterine DC	Angiogenesis and decidualization
	Uterine macrophage	Cervical ripening

DC, dendritic cell; NA, not applicable.

Tableau I-1: Diversité et fonctions des macrophages selon leur localisation [17].

Il est important de noter que les macrophages tissulaires sont également impliqués dans le maintien de l'homéostasie tissulaire notamment via l'élimination des cellules sénescents, dans le remodelage et la réparation des tissus lésés à la suite d'une inflammation sévère. Les macrophages du foie (cellules de Kupffer) sont impliqués dans l'élimination des débris des cellules sanguines (érythrocytes) et hépatiques, les ostéoclastes ont un rôle dans le remodelage du tissu osseux. Les macrophages alvéolaires expriment fortement les récepteurs de reconnaissance des motifs conservés des microorganismes afin d'éliminer les particules et microbes des voies respiratoires. Les nombreux macrophages de la muqueuse intestinale présentent des capacités de phagocytose et un pouvoir microbicide particulièrement élevés sans pour autant produire plus de cytokines pro-inflammatoires. L'existence de ce type de phénotype fonctionnel souligne donc l'importance du microenvironnement sur la différenciation des macrophages tissulaires qui est largement influencée par les signaux émis (molécules d'adhésion, cytokines, chimiokines, facteurs de croissance) par les cellules environnantes et les composés de la matrice extracellulaire.

De manière générale, la dispersion des monocytes se fait au hasard et de manière continue à l'état d'équilibre. Au contraire, en cas d'infection, l'apport de monocytes au site infectieux est permis par l'augmentation de l'expression d'adhésines à la surface des cellules endothéliales des vaisseaux qui facilitent l'attachement et la pénétration des monocytes dans les tissus [35].

I.2.2 Rôle du macrophage dans l'immunité innée

Aujourd'hui les macrophages ne sont plus associés à la seule notion de macrophages « éboueurs » mais sont considérés comme les acteurs majeurs de l'immunité innée. Ils remplissent des fonctions fondamentales comme la défense de l'hôte, la réparation, l'homéostasie des tissus et la régulation de l'immunité à travers un continuum de phénotypes fonctionnels spécifiques. Leur activation peut être causée par les différents médiateurs de l'inflammation présents au site infectieux avant l'arrivée des monocytes ou affectant les cellules résidentes. A titre d'exemple, des molécules d'adhésion dont l'expression est favorisée par l'induction de la réponse inflammatoire, ont la capacité d'activer les monocytes récemment recrutés. Comme nous le verrons dans cette section, il existe d'autres médiateurs qui influencent l'état d'activation du macrophage.

I.2.2.1 Reconnaissance des molécules étrangères

Lors d'une infection bactérienne, la première étape de la réponse inflammatoire est toujours marquée par la détection des agents pathogènes. Elle est permise par de nombreux récepteurs qu'ils soient localisés à la surface, dans le cytoplasme ou à la surface des endosomes. Ceux-ci sont capables d'interagir avec des structures moléculaires conservées telles que les acides nucléiques ou les composants des parois microbiennes, et d'induire l'activation des voies de signalisation du macrophage conduisant à la production de cytokines, de chimiokines et de médiateurs nécessaires à la réponse inflammatoire. L'initiation de fonctions effectrices adaptées et donc la coordination des réponses innée et adaptative, requièrent une interaction récepteur/agent pathogène finement régulée. De cette première étape cruciale dépend donc l'éradication de l'agent pathogène dans des conditions inflammatoires acceptables pour la cellule et l'organisme en limitant la toxicité et les dommages tissulaires associés.

I.2.2.1.1 Le système du complément

L'un des premiers mécanismes de défense suite à l'entrée d'un agent pathogène est le système du complément. Il est constitué d'un ensemble de protéines solubles présentes dans les fluides biologiques ou associées aux membranes qui se lient entre elles et qui favorisent l'élimination non spécifique des microorganismes [8]. Il existe plus d'une trentaine de protéines dont la plupart sont des enzymes protéolytiques dont l'activation est séquentielle (cascade enzymatique) et qui permettent *in fine* l'activation du complément selon trois voies majeures (Figure I-6).

La **voie classique** est activée suite à la reconnaissance d'un complexe antigène-anticorps ce qui en fait un composant de l'immunité adaptative. La **voie alterne** est déclenchée par l'interaction directe des protéines du complément activées avec le microbe, ce qui en fait une composante de l'immunité innée. Enfin la **voie des lectines**, appartenant également à l'immunité innée, est induite lors de la reconnaissance d'un résidu mannose présent à la surface de certains micro-organismes par une lectine plasmatique, le MBL (Mannan Binding Lectin) [37,38].

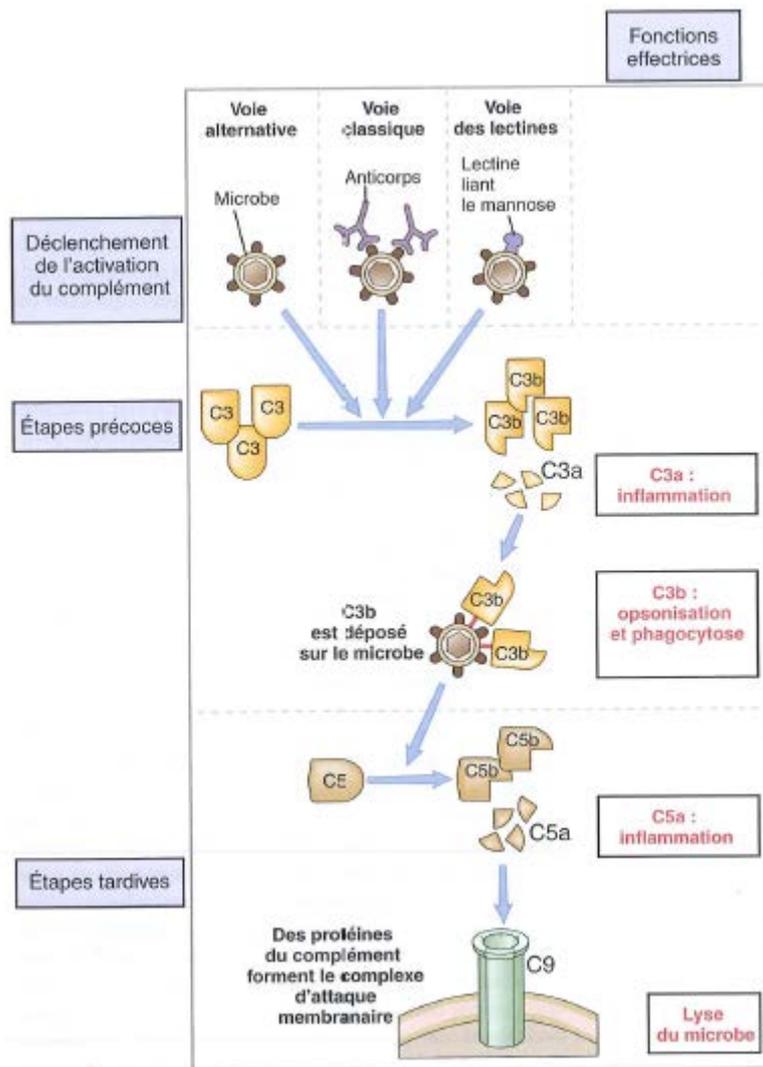


Figure I-6: Le système du complément et son activation [8].

L'activation du système du complément peut être déclenchée par trois voies distinctes conduisant toutes à la production de C3b lors des étapes précoces. Cette protéine conduit aux étapes tardives de l'activation du complément qui aboutissent à la production de nombreux peptides et à la polymérisation de C9, le « complexe d'attaque membranaire » (CAM) qui crée des pores dans la membrane plasmique des bactéries (GRAM⁺) et provoque leur mort par choc osmotique.

La protéine plasmatique C3 est un composant central de la voie du complément. Elle est clivée par les enzymes initialement produites dans les étapes précoces, et son fragment protéolytique principal, C3b se lie à l'agent pathogène de façon covalente et active en aval les protéines du complément fixées à la surface des microbes. Les trois voies d'activation du complément diffèrent quant à leur phase initiale mais elles partagent la même phase tardive et stimulent les mêmes fonctions effectrices. Les différents facteurs effecteurs du complément sont impliqués dans la défense de l'hôte à trois niveaux différents. C3b et C5b qui recouvrent la surface des micro-organismes agissent comme des opsonines favorisant leur prise en charge et donc l'élimination par les phagocytes.

C5b induit le recrutement des composants du complexe d'attaque membranaire (CAM) qui s'insère dans la membrane cellulaire bactérienne et perturbe ainsi la perméabilité membranaire ce qui provoque la lyse de la cellule par un choc osmotique ou par apoptose. Il est intéressant de noter que le CAM n'a aucune action sur les bactéries Gram-positives en raison de leur paroi épaisse riche en peptidoglycane [39]. Les facteurs C3a et C5a favorisent le recrutement chimiotactique des phagocytes sur le site d'activation du complément et stimulent la production de composés oxygénés toxiques. Ils jouent donc un rôle primordial dans l'inflammation.

Les macrophages reconnaissent les molécules du complément grâce à des récepteurs spécifiques impliqués dans la phagocytose : les récepteurs CR1 (Complement Receptor 1) (CD35), CR3 (Mac-1, CD11b/CD18) et CR4 (CD11c/CD18) [40]. De même, les microbes recouverts de complément dits opsonisés, sont reconnus par les phagocytes via ces récepteurs. Le système du complément participe donc à l'opsonisation, à la réponse inflammatoire, à la destruction des agents pathogènes, mais également aux fonctions de réparation et le retour à l'homéostasie (Figure I-7) [37,38,41].

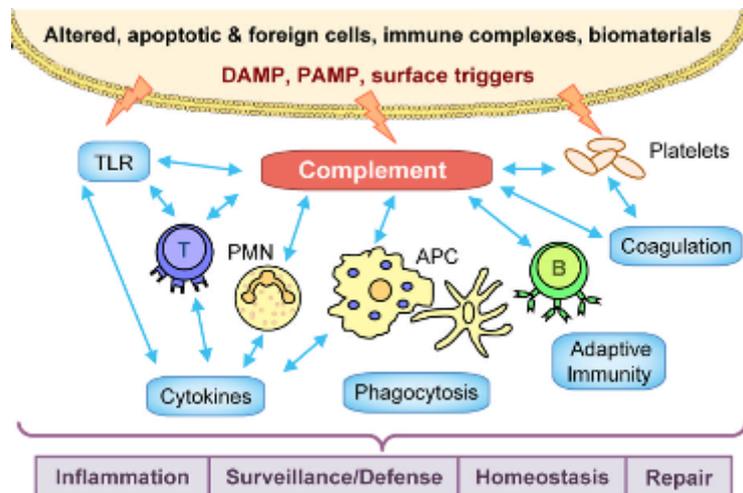


Figure I-7: Le réseau du système du complément et son implication dans les processus cellulaires [41].

Induit directement par des particules étrangères ou des cellules altérées, la plupart des mécanismes associés à la défense et à l'homéostasie de l'hôte sont initiés par le système du complément ; celui-ci agissant comme un médiateur important des processus physiologiques et patho-physiologiques. DAMP, damage associated molecular patterns; PAMP, pathogen-associated molecular pattern; PMN, polymorphonuclear cells; TLR, Toll-like receptor.

I.2.2.1.2 Les PRR (Pattern Recognition Receptors)

L'initiation de la réponse immunitaire innée repose sur la reconnaissance des agents pathogènes qui expriment spécifiquement des motifs moléculaires conservés, nommés PAMPs ou MAMPS (Pathogen/Microbial Associated Molecular Patterns) [12,42]. Les PAMPs, présents chez les micro-organismes correspondent par exemple aux acides nucléiques, aux lipopolysaccharides (LPS) présents dans la paroi des bactéries Gram-négatives, à l'acide lipotéichoïque (LTA) ou aux peptidoglycanes contenus dans la paroi des bactéries Gram positives, ou encore aux glucanes et mannanes associés aux parois de champignons. Les PAMPs sont reconnus par les phagocytes grâce un ensemble de récepteurs, les PRRs (pour Pattern Recognition Receptors). Les PRRs sont communément exprimés par les phagocytes et les cellules dendritiques, mais également par de nombreux types cellulaires comme les lymphocytes, les cellules épithéliales ou endothéliales. En plus des PAMPs, les PRRs peuvent également reconnaître diverses molécules endogènes qui sont autant de signaux d'alerte lors de dommages cellulaires tels que les alarmines sécrétées par la lyse des cellules infectées ou par les leucocytes des épithéliums ainsi stimulés [43,44]. Les alarmines associées aux PAMPs constituent les DAMPs (Damaged Associated Molecular Patterns) et jouent un rôle important dans l'induction de la réponse inflammatoire, la survie et l'homéostasie de l'hôte notamment grâce à leurs propriétés chimiotactiques et antimicrobiennes. Le Tableau I-2 présente une liste non exhaustive des alarmines et leurs fonctions.

Molécule	Passive release ^a	Active nonclassical secretion	Role in inflammation/immunity	Promoting tissue regeneration
HMGB1	•	•	•	•
S100s		•	•	1
HDGF	•	•		2
HSPs		•	•	
IL-1a		•	•	
Uric acid			•	
Cathelicidins		3	•	•
Defensins		3	•	
EDN		3	•	
Galectins		•	•	
Thymosins			•	•
Nucleolin		•	•	
Annexins		•	•	

Tableau I-2: Les principales alarmines et leurs propriétés fonctionnelles [43].

La présence d'un point indique que le critère est rempli, son absence indique que la donnée n'est pas connue. ^a Le résultat positif signifie que la molécule est produite par les cellules nécrotiques mais pas par les cellules apoptotiques. 1. A faible concentration, S100B est neutrotrophe mais pro-apoptotique à forte concentration. 2. Neurotrophe. 3. Libéré par les neutrophiles lors de la dégranulation.

Les PRRs regroupent plusieurs familles de récepteurs, notamment les récepteurs Toll-like (TLRs), les Lectines de type C (CLRs), les récepteurs NOD-like (Nucleotide Oligomerization Domain-like receptors ou NLRs) et les récepteurs scavenger (SR) [44].

Les **récepteurs TLRs** sont les premiers PRRs à avoir été identifiés. Initialement mis en évidence chez la drosophile, le TLR4 fut d'abord décrit comme le récepteur essentiel du développement dorso-ventral de l'embryon avant d'être identifié comme inducteur de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire [45–47], la déficience de TLR4 étant liée à l'absence de réponse au LPS [48]. Les TLRs constituent actuellement le groupe de PRRs le mieux caractérisé et sont capables de reconnaître un large panel de PAMPs [12,44,49]. Ils appartiennent à une grande famille de 10 récepteurs dans l'espèce humaine de TLR1 à TLR10, et 12 récepteurs de TLR1 à TLR13 chez la souris, le TLR10 étant un pseudo-gène [44,50]. Les TLRs sont spécifiques des agents microbiens et peuvent distinguer les PAMPs dérivés de virus, de bactéries, de parasites, de mycobactéries ou encore de champignons (Tableau I-3).

PRRs	Localization	Ligand	Origin of the Ligand
TLR			
TLR1	Plasma membrane	Triacyl lipoprotein	Bacteria
TLR2	Plasma membrane	Lipoprotein	Bacteria, viruses, parasites, self
TLR3	Endolysosome	dsRNA	Virus
TLR4	Plasma membrane	LPS	Bacteria, viruses, self
TLR5	Plasma membrane	Flagellin	Bacteria
TLR6	Plasma membrane	Diacyl lipoprotein	Bacteria, viruses
TLR7 (human TLR8)	Endolysosome	ssRNA	Virus, bacteria, self
TLR9	Endolysosome	CpG-DNA	Virus, bacteria, protozoa, self
TLR10	Endolysosome	Unknown	Unknown
TLR11	Plasma membrane	Profilin-like molecule	Protozoa
RLR			
RIG-I	Cytoplasm	Short dsRNA, 5'triphosphate dsRNA	RNA viruses, DNA virus
MDA5	Cytoplasm	Long dsRNA	RNA viruses (Picornaviridae)
LGP2	Cytoplasm	Unknown	RNA viruses
NLR			
NOD1	Cytoplasm	iE-DAP	Bacteria
NOD2	Cytoplasm	MDP	Bacteria
CLR			
Dectin-1	Plasma membrane	β -Glucan	Fungi
Dectin-2	Plasma membrane	β -Glucan	Fungi
MINCLE	Plasma membrane	SAP130	Self, fungi

Tableau I-3: La détection des PAMPs par les TLRs et autres PRRs [44].

Certains TLRs sont exprimés à la surface des cellules sur la membrane cytoplasmique, et sont spécialisés dans la reconnaissance des composés des parois microbiennes (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 et probablement TLR11 et TLR12 murins, et TLR10 humain) alors que d'autres tels que TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont exprimés sur la membrane des vésicules intracellulaires et reconnaissent les acides nucléiques [42,49,51–53]. Plus particulièrement, TLR1, TLR2 et TLR6 se lient aux lipoprotéines, TLR4 aux lipopolysaccharides (LPS) bactériens (endotoxines), TLR5 à la flagelline alors que TLR3 reconnaît les ARN double-brins (ds), TLR7 et TLR8 les ARN simple-brin (ss) et TLR9 l'ADN contenant des motifs CpG (Tableau I-3) [49]. Récemment il a été montré que TLR11, fonctionnellement similaire à TLR5 mais exprimé à la surface des cellules, était également présent dans les compartiments cellulaires [50]. Chez la souris, on considère que TLR13 est également exprimé dans les endosomes, bien que son ligand n'ait pas encore été formellement identifié [52].

Les vésicules intracellulaires des macrophages et des autres cellules immunitaires sur lesquelles les TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9 sont exprimés, sont constituées du réticulum endoplasmique, des endosomes, des lysosomes et endolysosomes [52]. Ces TLRs intracellulaires, qui reconnaissent spécifiquement les acides nucléiques requièrent l'internalisation préalable des virus et autres agents pathogènes. En revanche, les acides nucléiques présents dans l'environnement extérieur de la cellule sont rapidement détruits et éliminés par des nucléases de façon indépendante des TLRs et sans pénétrer dans ces vésicules. Ainsi la localisation intracellulaire de ces TLRs relève d'une importance capitale dans la discrimination et l'évitement des acides nucléiques de l'hôte, dont la reconnaissance serait à l'origine de l'initiation de processus auto-immuns [42].

Les TLRs forment principalement des homodimères mais aussi quelques hétérodimères. Par exemple, TLR2 est capable de s'associer avec TLR1 ou TLR6 et de reconnaître ainsi une plus grande diversité de molécules [54].

Le rôle des TLRs dans la reconnaissance des alarmines a été mis en évidence plus récemment avec notamment l'interaction de TLR2 et TLR4, avec HMGB1, S100 ou HSP70 [49,55,56] ou encore celle de TLR9 avec HMGB1 [57,58].

Les TLRs sont des molécules transmembranaires de type I qui possèdent un domaine extracellulaire de reconnaissance des PAMPs, constitué de nombreux motifs riches en leucines (LRR), un domaine transmembranaire et un domaine de transduction du signal intracytoplasmique (TIR, Toll-IL-1 Receptor), qui active les voies de signalisation en aval [50,59].

A l'issue de la liaison avec les PAMPs correspondants, les TLRs recrutent une ou plusieurs molécules adaptatrices spécifiques qui vont engendrer un signal intracellulaire incluant des voies de phosphorylation, d'ubiquitylation ou d'interactions protéine-protéine (Figure I-8).

Tous les TLRs, à l'exception de TLR3 activent des voies de signalisation impliquant MyD88 (Myeloïd Differentiation Factor 88) en association avec TIRAP (TIR-domain containing Adaptor Protein ou MAL) et IRAK (IL-1 Receptor-Associated Kinase), aboutissant à l'activation des facteurs de transcription NFκB (Nuclear Factor-κB, après translocation de IκB du cytoplasme vers le noyau) et AP-1 (Activator Protein-1), et des MAP kinases (Mitogen-Activated Protein) [50,52,59–61]. Cette cascade aboutit à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNFα (Tumor Necrosis Factor α), IL-6 ou IL-1β (Interleukine-6 ou -1β).

Cependant, TLR3 et TLR4 utilisent une voie de signalisation qui est indépendante de MyD88, et qui repose sur le recrutement de la protéine adaptatrice TRIF (TIR-domain-containing adaptor protein inducing interferon-β ou TICAM-1) qui induit la translocation d'IRF3 (IFN-Regulatory Factor 3) vers le noyau. Cette voie est responsable de la production d'IFN (Interféron) de type 1 qui peut bloquer la réplication virale [62]. L'activation de cette voie alternative a été montrée grâce à des souris déficientes pour MyD88, chez lesquelles la stimulation via les récepteurs TLR3 et TLR4 ne modifie pas la production d'IFN-β [63].

TLR4 est le seul TLR qui recrute quatre protéines adaptatrices en activant deux voies de signalisation distinctes : MyD88-dépendante et TRIF-dépendante, avec des cinétiques différentes [50]. TLR4 recrute MyD88, TIRAP et IRAK (puis TRAF6) conduisant à l'activation précoce de NFκB et des MAP kinases. TLR4 subit ensuite une endocytose et forme un complexe avec TRAM (TICAM-2) et TRIF à la surface d'une vésicule intracellulaire qui induit la phosphorylation d'IRF3 (par TRAF3), qui est responsable de la synthèse d'IFN-β [64]. TRAM-TRIF recrute également TRAF6 déclenchant une activation tardive de NFκB et des MAP kinases [65,66].

La réponse inflammatoire induite par les TLRs varie donc selon le type de TLRs engagé et les molécules adaptatrices recrutées (Figure I-8). Par exemple, les lipoprotéines bactériennes reconnues par TLR2 sont à l'origine de la production de TNFα via NFκB par le macrophage [47] alors que la liaison LPS/TLR4 active à la fois NFκB et IRF3 entraînant la production d'IFN-β [63,67].

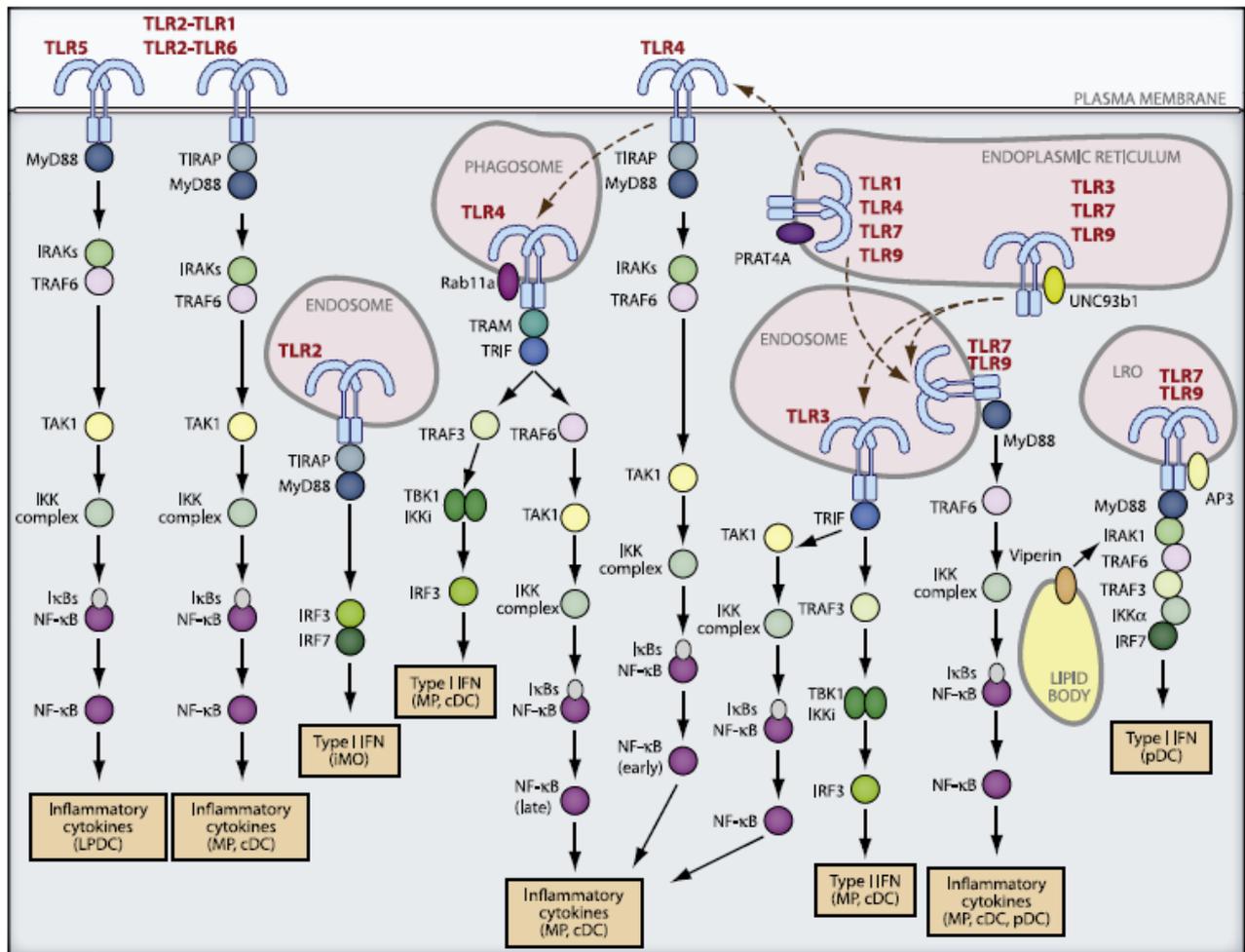


Figure I-8: Les voies de signalisation des TLRs [50].

L'engagement des TLRs induit des voies d'activation distinctes ou similaires dans un nombre varié de types cellulaires tels que les macrophages (MP), les cellules dendritiques conventionnelles (cDC), les DC plasmacytoïdes (pDC), les DC de la lamina propria (LPDC) ainsi que dans les monocytes inflammatoires (iMO). La reconnaissance des PAMPs engendre des changements conformationnels des TLRs qui favorisent des interactions d'homodimérisation ou d'hétérodimérisation des récepteurs puis le recrutement de protéines adaptatrices spécifiques telles que MyD88, TIRAP, TRIF ou encore TRAM. La cascade de signalisation induite permet la translocation nucléaire d'un ou plusieurs facteurs de transcription selon différentes cinétiques, responsable de la production de cytokines inflammatoires ou d'IFN de type I. La réponse inflammatoire déclenchée par liaison TLRs/PAMPs dépend de chaque TLR engagé.

Un agent pathogène est généralement composé d'une multitude de PAMPs, qui peuvent activer plusieurs PRRs de manière simultanée. De plus, un même PRR peut reconnaître plusieurs PAMPs. Il existe donc une forte redondance de ce système de reconnaissance. Il n'est donc pas surprenant que dans une approche globale, il existe des collaborations entre les différents TLRs mais aussi entre les TLRs et d'autres PRRs [60]. Les TLRs, en concert ou non avec les autres PRRs orchestrent à la fois des réponses spécifiques contre les agents pathogènes et des réponses spécifiques de chaque type cellulaire en fonction du répertoire de PRRs exprimés [50,61].

La collaboration entre différents récepteurs permet de diminuer la probabilité que la reconnaissance d'un agent échappe au système immunitaire comme par exemple à la suite d'une stratégie d'évasion parmi celles développées par les agents pathogènes, afin de contourner la variabilité génétique de l'hôte ; elle permet également d'établir une réponse adaptée au type pathogène rencontré [61]. Par exemple, TLR4 et TLR7 collaborent pour induire la production d'IL-12p70 alors qu'aucun de ces récepteurs stimulés seuls n'est capable d'activer cette production (Figure I-9) [68]. Les cellules dendritiques ainsi activées, favorisent le développement d'une réponse T-helper-1 (T_h1) plus marquée que celle permise par chacun des TLRs pris isolément. Cette synergie concerne également d'autres cytokines telles que IL-23, IL-10, IL-6, $TNF\alpha$, IL-1 β ou encore COX2 (Cyclooxygénase-2). Des observations similaires ont montré l'efficacité de la collaboration TLR3/TLR7 qui favorise la différenciation des lymphocytes T cytotoxiques par les cellules dendritiques [69]. Des effets synergiques ont également été mis en évidence suite à la co-activation de TLR2 et TLR4, notamment sur la production de $TNF\alpha$, d'IL-6 ou de MIP-1 α (Macrophage Inflammatory Protein 1 α) [70–72].

Si dans la plupart des cas, la collaboration de plusieurs TLRs amplifie la réponse inflammatoire, il existe un phénomène de tolérance lorsque que la réponse inflammatoire est excessive. On parle d'homotolérance lorsque la réponse suite à la stimulation d'un TLR avec un ligand donné, qui conduit à la production de cytokine(s), est diminuée à la suite d'une première stimulation avec le même ligand. L'hétérotolérance repose sur le même principe excepté que la seconde stimulation est opérée avec un ligand de nature différente du premier utilisé [60,73]. Par exemple, la co-activation de TLR3/TLR2 entraîne une baisse de la production de CXCL10 et d'IL-12p35 [74].

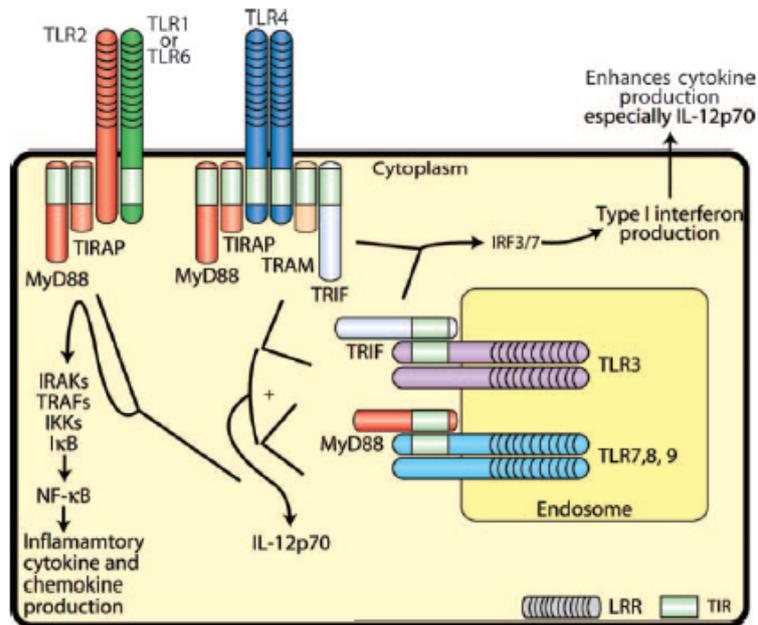


Figure I-9: La collaboration entre les différents TLRs [61].

Alors que tous les TLRs stimulent la production de cytokines et de chimiokines inflammatoires via l'activation de NFκB, ils utilisent différentes protéines adaptatrices ce qui permet de promouvoir diverses réponses inflammatoires. La combinaison spécifique des TLRs (i.e. TLR4 + TLR7) favorise la production de cytokines (IL-12p70) alors que la stimulation individuelle de chaque récepteur n'induit que faiblement sa synthèse.

Les **Lectines de type C (CLRs)** sont une famille de plus de 1000 récepteurs solubles ou transmembranaires divisés en 17 groupes selon leur phylogénie et leur structure, possédant un ou plusieurs domaines lectine de type-C (CTLDs) caractéristiques [75]. Présents à la surface des cellules, les CLRs participent comme les TLRs à la reconnaissance directe et indirecte des composés microbiens [76]. En revanche, les CLRs (et certains TLRs) et leurs voies de signalisation sont essentiels à l'immunité antifongique [77,78]. Bien qu'initialement décrits comme ayant une activité calcium-dépendante, tous les membres de cette superfamille des CLRs ne nécessitent pas de calcium ni même de ligand poly-osidique pour fonctionner [78]. Différents CLRs extracellulaires et transmembranaires incluant le récepteur mannose (MR, MRC1 ou CD206), Dectin-1 (CLEC7A ou CD369), Dectin-2 (CLEC6A ou CLECSF10), DC-SIGN (Dendritic cell specific ICAM-3-grabbing non integrin ou CD209 ou SIGNR1 et SIGNR3, leurs homologues murins) ainsi que les collectines (MBL pour Mannose-binding lectin, SP-A pour surfactant protein A et SP-D pour surfactant protein D), représentés dans la Figure I-10, sont impliqués dans la reconnaissance d'un large panel de poly-osides d'origine fongique issus de nombreuses espèces causant des maladies chez l'homme (Tableau I-3).

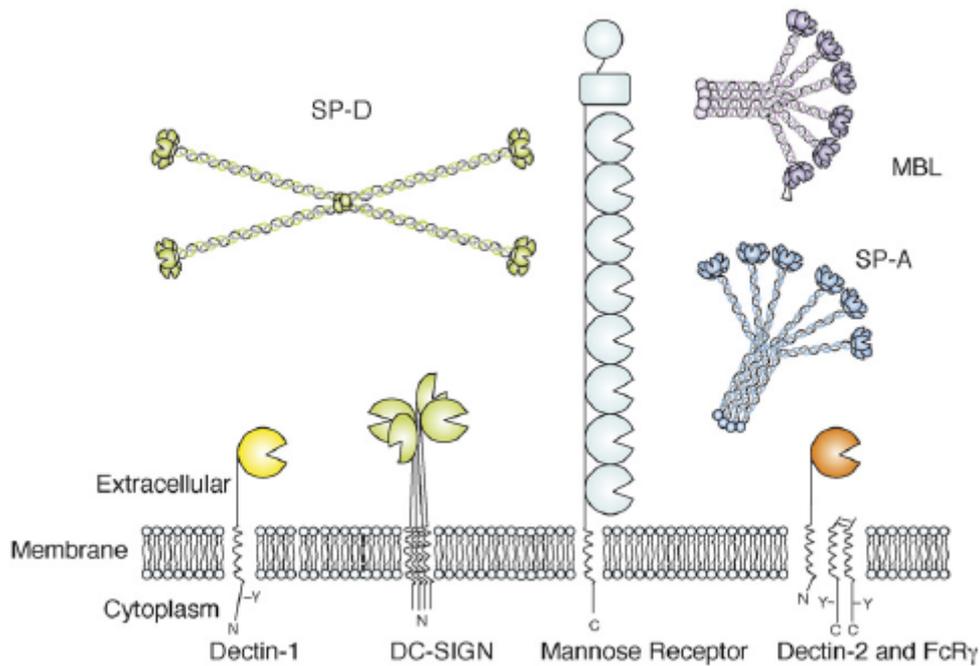


Figure I-10: Représentation structurale des CLR [78].

La structure de Dectin-1, DC-SIGN, Mannose receptor, SP-D, MBL, SP-A, Dectin-2 et Fc γ est présentée sans échelle. MBL, SP-A et SP-D sont exprimés sous forme d'homo-oligomères. C, C terminal ; N, NH₂ terminal ; Y, ITAM (immunoreceptor tyrosine-based activation motif).

Malgré la présence d'un domaine très conservé, les 1000 membres de la famille des CLR sont fonctionnellement très diversifiés et sont impliqués dans l'immunité innée mais aussi de nombreux processus biologiques tels que l'adhésion cellulaire, la modélisation et la réparation tissulaire, l'activation plaquettaire et celle du complément, l'endocytose et la phagocytose, la régulation des cellules NK et l'homéostasie [75,78–80]. Cette grande variabilité fonctionnelle repose probablement sur la capacité des CLR à reconnaître aussi bien des ligands exogènes qu'endogènes, à l'origine de nombreuses interrogations quant à l'évolution de ces récepteurs [81].

Les récepteurs Mannose (MR) et Dectin-1 sont particulièrement impliqués dans la défense antifongique. Les mécanismes d'action en aval de ces récepteurs seront plus largement abordés dans la section *Interaction spécifique des BG et autres composants de la paroi de levure avec le macrophage*.

Brièvement, Dectin-1 possède un seul domaine lectin-like de type C en position extracellulaire qui permet la reconnaissance des résidus osidiques (CTLD) et reconnaît essentiellement les $\beta(1,3)$ -glucanes présents dans les parois cellulaires des plantes, des champignons, des bactéries et des levures comme *Candida albicans* [82].

Son domaine cytoplasmique contient un motif de type ITAM (ITAM-like motif ou hem-ITAM pour immunoreceptor tyrosine-based activation) qui est capable d'induire un signal médié par Syk et CARD9 (Spleen tyrosine kinase et CASpase Recruitment Domain 9) [76,83] (Figure I-11). L'engagement de Dectin-1 par *C. albicans* ou le Zymosan extrait de *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) déclenche une multitude de réponses qui incluent la maturation des DC, la phagocytose, l'explosion respiratoire (ou « burst oxydatif ») et la production de cytokines pro- et anti-inflammatoires (TNF α , IL6, IL-23, CXCL2 et IL-10). Dans les macrophages, il semblerait que la capacité de Dectin-1 à produire ce genre de réponse requiert la co-stimulation par un des TLRs [84].

Le MR est caractérisé par la présence de huit CTLD qui reconnaissent les résidus mannose, fucose et Nacétylglucosamide [85]. Etant donné sa complexité, il n'est pas surprenant que le MR conduise à une grande variété de réponses cellulaires. Il est capable de favoriser la reconnaissance de certains agents pathogènes en liant les antigènes mannosylés, tout comme d'induire des processus homéostatiques comme par exemple la clairance de composés endogènes ou l'adhésion cellulaire. En effet, en réponse à *Pneumocystis* et *Cryptococcus neoformans*, MR active NF κ B et la production de cytokines inflammatoires telles que GM-CSF, IL-12, IL-6, ou IL1 β alors qu'il peut également inhiber la synthèse de TNF α en réponse à *Pneumocystis* [86]. MR peut ainsi être à l'origine de signaux opposés mais ne semble pas jouer un rôle prépondérant dans la résistance aux infections fongiques [85].

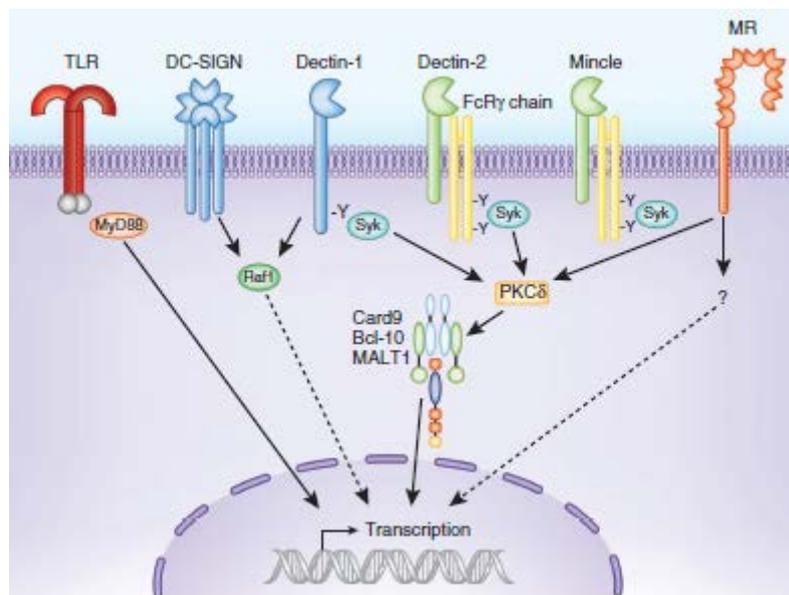


Figure I-11: Les CLR transmembranaires et leurs voies de signalisation intracellulaires [77].

Les *récepteurs NOD-like (NLRs)* regroupent principalement 2 sous-familles de récepteurs présents dans le cytoplasme : les récepteurs NOD (Nucleotide-binding Oligomerization Domain) et les récepteurs NLRP ou NALP (NLRP : NOD, leucine rich repeat and pyrin domain containing ; NALP : NACHT, LRR and PYD domains-containing protein), capables de reconnaître des PAMPS intracellulaires [87]. A ce jour, 32 membres de cette famille sont répertoriés chez l'homme et au minimum 33 chez la souris. Bien que majoritairement exprimés dans les cellules immunitaires, les NLR sont également présents dans les cellules non immunitaires notamment les cellules épithéliales et les cellules mésothéliales. Les NLRs sont caractérisés par leurs trois domaines :

- un domaine N-terminal d'interaction protéine-protéine qui peut être un domaine de recrutement caspase (CARD : Caspase Recruitment Domain) pour les protéines NODs ou un domaine de liaison à la pyrine (PYD : Pyrine Domain) pour les NLRPs,
- un domaine central NACHT nécessaire à l'oligomérisation
- et un domaine C-terminal LRR riche en leucine, comme pour les TLRs, capable de reconnaître les ligands microbiens ou les alarmines.

Bien que présentant une forte homologie de séquence, les NLRPs se distinguent par leur signal de transduction qui active soit la voie NF κ B (pour les récepteurs NODs) soit la caspase-1, l'enzyme de maturation de l'IL-1 β (pour les récepteurs NLRPs). Parmi les récepteurs NODs, NOD1 et NOD2 furent découverts les premiers et sont donc les NLRs les mieux décrits. Alors que NOD1 est exprimé quasi-universellement, l'expression de NOD2 reste réservée à certains types cellulaires, notamment les macrophages [88], les cellules dendritiques [89], les kératinocytes et les cellules épithéliales de l'intestin. NOD1 et NOD2 sont activés par certains résidus de la dégradation des peptidoglycanes provenant des bactéries Gram-positives et -négatives, dont le MDP (muramyl dipeptide) reconnu comme le ligand spécifique de NOD2 [42,90]. NLRP3, également appelé NALP3 est le récepteur le plus décrit de la famille des NALPs. La maturation de la pro-IL-1 β cytoplasmique et inactive, synthétisée en réponse aux signaux TLR requiert la formation d'un complexe protéique appelé inflammasome, identifié en 2002 [91]. Ce complexe formé de la pro-caspase-1 (forme inactive de la caspase-1), de NLRP3 (ou NLRP1) et de la protéine ASC (Apoptosis associated Speck-like protein containing a CARD) est responsable de la maturation de la caspase-1,

impliquée dans le clivage de la pro-IL-1 β (et de la pro-IL-18) et donc dans la sécrétion de la forme active de ces cytokines [92].

Bien que le MDP *per se* soit relativement peu activateur de la production de cytokines par le macrophage, il s'avère que cette molécule amplifie significativement la production de cytokine médiée par le LPS, de façon dépendante de CARD9, et en raison de l'activation de NF κ B [93] (Figure I-12).

Cette réponse synergique entre NOD2 et TLR4 a été bien montrée pour la synthèse protéique de TNF α , IL-6 et IL-12. L'amplification du signal NOD/TLR ne concerne pas seulement TLR4 mais peut être étendue à d'autres TLRs, et notamment à TLR2 et TLR3. En effet, plusieurs études utilisant des monocytes humains, ont mis en évidence les effets synergiques de NOD1 avec TLR2, 6, 5, 7/8 pour la production de TNF α , IL-6, IL-10, GM-CSF [94], et NOD2 avec TLR2 et TLR3 pour l'induction de TNF α , IL-10 et IL-1 β [95].

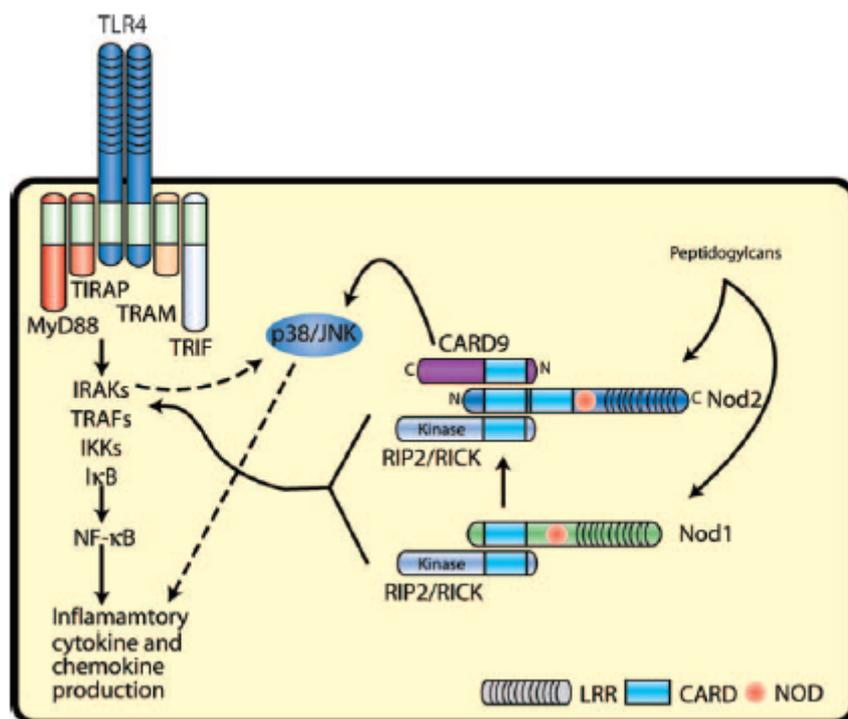


Figure I-12: La collaboration NOD/TLRs [61].

Tout comme les TLRs, les protéines NODs activent la production de cytokines/chimiokines pro-inflammatoires grâce à l'activation de NF κ B et suite à l'activation de RIP2 (ou RICK). La co-activation TLR/NOD induit une production de cytokine et de chimiokine plus intense que celle permise par l'activation d'un seul récepteur. NOD2 active les MAPKs grâce à l'interaction avec CARD9, nécessaire à l'induction d'une sécrétion cytokinique efficace médiée par NOD2.

Les *récepteurs Scavenger (SRs)* dits ‘éboueurs’ sont divisés en deux classes, les SRs de classe A (SR-A) et les SRs de classe B dont SR-B1 et CD36. Les récepteurs SR-A et CD36 sont impliqués dans la reconnaissance et la phagocytose des bactéries via les PAMPs (LTA, LPS, ADN CpG) mais sont également capables de se lier aux cellules apoptotiques exprimant des phosphatidylsérines et les lipoprotéines de faible densité oxydées ou oxLDL [96,97], contribuant ainsi à l’homéostasie des lipoprotéines. Par ailleurs, ils jouent un rôle dans la régulation de l’inflammation afin d’éviter des dommages excessifs causés par la mise en place d’une réponse protectrice inappropriée [98].

Grâce à l’expression d’une large gamme de récepteurs capables de reconnaître des motifs répétés mais divers, l’intrusion d’agents pathogènes est directement repérée par les cellules de l’immunité innée. L’induction d’une réponse inflammatoire de nature et d’intensité variable permet donc une élimination rapide et efficace des micro-organismes.

I.2.2.1.3 Les adhésines

Les macrophages expriment à leur surface certaines molécules leur permettant d’adhérer aux cellules situées dans leur environnement direct et également à la matrice extracellulaire. Regroupées sous le nom générique d’adhésines, les sélectines et intégrines sont porteuses de fonctions spécifiques. On peut trouver les L- et P-sélectines à la surface des monocytes/macrophages et les E-sélectines à la surface des cellules endothéliales activées. Les sélectines ont la particularité de lier des motifs glucidiques sur leurs récepteurs. Le caractère transitoire de la liaison des L, P et E-sélectines et de leurs récepteurs glucidiques permet aux monocytes et aux neutrophiles de la circulation sanguine d’être ralentis dans le flux vasculaire, de rouler sur les surfaces endothéliales et de pénétrer dans les tissus par diapédèse en cas d’infection [8,99]. Un mécanisme plus détaillé sera proposé dans la section *Recrutement leucocytaire* de cette revue bibliographique.

Les intégrines, quant à elles, autorisent une liaison de plus grande affinité des monocytes/macrophages avec la matrice extracellulaire et d’autres cellules incluant les cellules endothéliales sous l’effet des chimiokines. Elles « intègrent » les signaux extrinsèques et les traduisent en modifiant le cytosquelette. Parmi ces intégrines, on peut retrouver LFA-1 (Lymphocytes Function-associated Antigen 1), CR3 et VLA-4. Les deux premières ont pour ligands le fibrinogène et ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) alors que la dernière se lie à la fibronectine et à VCAM-1 (Vascular Adhesion Molecule-1).

Les molécules de type CAM sont exprimées à la surface des cellules endothéliales et permettent la migration des monocytes dans les tissus après modification de leur état d'affinité et le ralentissement de leur flux par les sélectines. Notons qu'ICAM-1 est également exprimé à la surface des macrophages et des lymphocytes, leur permettant d'assurer une liaison stable lors de la reconnaissance antigénique [8,100]. Nous reviendrons également plus tard sur ce point (*Cf. section Recrutement leucocytaire*).

I.2.2.1.4 Les autres molécules de surface

Les macrophages arborent également d'autres groupes de récepteurs à leur surface, qui sont impliqués dans diverses fonctions. On trouve les récepteurs des différentes cytokines (IL-2, -3, -4, -6, TNF et les IFN- α , - β , - γ) et facteurs de croissance (GM-CSF, M-CSF, G-CSF), qui sont respectivement indispensables à la différenciation et à la modulation de l'état d'activation de la cellule [35].

En parallèle, les monocytes/macrophages expriment les récepteurs CCR, CXCR et CX3CR des différentes catégories de chimiokines, cytokines chimio-attractantes produites par l'ensemble des leucocytes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les kératinocytes. Comme nous le verrons plus tard, les chimiokines favorisent la mobilisation et le recrutement des monocytes (et des neutrophiles) sur les sites infectieux [101].

En tant que cellules présentatrices d'antigènes aux lymphocytes T, les macrophages expriment les molécules des complexes majeurs d'histocompatibilité (CMH) de type I et II, portant des peptides endogènes ou exogènes. Ces peptides sont présentés aux lymphocytes T qui reconnaissent de façon spécifique ces fragments antigéniques dans le contexte du soi et génèrent en conséquence une réponse immunitaire spécifique. Le CMH de classe I est reconnu par les lymphocytes T cytotoxiques avec la participation de CD8, alors que le CMH de classe II est reconnu par les lymphocytes T auxiliaires en interaction avec CD4 [102]. Les co-récepteurs CD4 et CD8 augmentent l'affinité de la reconnaissance du complexe peptide/CMH I ou II par les récepteurs T.

Enfin, nous terminerons cette liste non exhaustive par le groupe des récepteurs de la fraction constante Fc γ (Fc γ RIA, IIA, IIB, IIIA) et Fc ϵ RIIb subdivisés en deux catégories pour les deux types d'immunoglobulines IgG et IgE [103,104]. Ces récepteurs sont responsables de la fixation et de la phagocytose qui s'ensuit de l'opsonisation des particules microbiennes (fixation d'anticorps).

Notons que seul Fc γ RIIB n'induit pas la phagocytose mais participe à la signalisation intracellulaire.

I.2.2.2 Phagocytose

I.2.2.2.1 Définition et rôle

La phagocytose est le processus par lequel les macrophages, les cellules dendritiques et autres phagocytes myéloïdes internalisent diverses cibles particulières ; c'est un mécanisme clé de l'immunité innée. Cette fonction permet l'élimination de particules dont le diamètre est supérieur à 0,5 μm tels que les micro-organismes, les débris cellulaires et les cellules tumorales. Ce phénomène dépend de la polymérisation de l'actine. Il est capital pour les mécanismes de la défense anti-infectieuse, le remodelage et l'homéostasie tissulaire [105].

Bien que la grande majorité des cellules de l'organisme disposent des certaines capacités d'internalisation, le processus de phagocytose reste la spécialité des phagocytes professionnels : les macrophages, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Cependant, en plus des macrophages, d'autres cellules comme les cellules épithéliales peuvent prendre en charge des corps apoptotiques [106]. Notons que cette forme de phagocytose ne déclenche pas d'inflammation, elle s'accompagne uniquement de la production de TGF- β résultant de la reconnaissance de résidus phosphatidyl sérine.

D'autre part, les monocytes sont également dotés de capacités de phagocytose mais elles sont largement inférieures à celles du macrophage compte tenu de la différence d'expression des récepteurs de surface. Il semblerait également que le processus de phagocytose diffère selon le type cellulaire concerné, bien que les neutrophiles et les macrophages/cellules dendritiques partagent de nombreuses caractéristiques communes [107].

I.2.2.2.2 Voies d'activation et étapes clés

La phagocytose est induite par la reconnaissance d'un antigène associé à la liaison au(x) récepteur(s) exprimé(s) à la surface des phagocytes (« tasting ») (Figure I-13). Cette reconnaissance peut être médiée (i) directement par l'interaction des PAMPs situés à la surface du micro-organisme avec certains PRRs (SRs ou CLR), ou alors (ii) indirectement par l'intermédiaire des opsonines fixées à la surface des agents pathogènes. Les différents récepteurs impliqués dans la phagocytose et leurs ligands sont détaillés dans le Tableau I-4.

Les opsonines peuvent être des anticorps ou des molécules appartenant au système du complément, les premiers étant reconnus par les FcγR et les derniers par les CR (CR1, CR3 ou CR4). En se fixant aux antigènes, ces molécules favorisent la détection par les cellules exprimant ces récepteurs, et ensuite leur internalisation.

Type of phagocytosis	Receptors	Ligands
Opsonic phagocytosis	Fc receptor family (FcγRI, FcγRIIA and FcγRIIA)	Antibody-opsonized targets
	Complement receptors (CR1, CR3 and CR4)	Complement-opsonized targets
	α5β1 integrin	Fibronectin
Non-opsonic phagocytosis	Dectin 1	β-glucan
	Macrophage receptor MARCO	Bacteria (undefined specific ligand)
	Scavenger receptor A	Bacteria (diverse charged molecules)
	αVβ5 integrin	Apoptotic cells
Triggered (nonspecific) phagocytosis	Toll-like receptors	Various, including lipopolysaccharides and lipopeptides

FcγR, Fc receptor for IgG.

Tableau I-4: Les différents récepteurs impliqués dans la phagocytose [105].

Le processus d'internalisation ainsi initié se poursuit par la formation de pseudopodes qui englobent la particule, pour ensuite fusionner et constituer le phagosome, résultat de l'invagination de la membrane plasmique du phagocyte (« feeling ») et du regroupement des récepteurs (« clustering ») (Figure I-13).

Actuellement, deux scénarii sont évoqués quant à l'étendue de l'interface particule/membrane plasmique. Le premier nommé « zipper » repose sur un allongement de part et d'autre de la particule, strictement conditionné par la liaison particule/récepteur, alors que le second dit « trigger » suppose qu'une seule interaction initiale suffise à la création de la vacuole intracellulaire [108].

L'englobement de la particule conduit à la réorganisation du réseau d'actine en lien avec celle de la membrane plasmique des cellules grâce à une cascade de phosphorylation de certaines kinases. La fermeture du phagosome est conditionnée par la fusion de vésicules issues d'organites cellulaires (réticulum endoplasmique, endosome, lysosome) (« swallowing »). Le phagosome va ensuite subir des étapes de maturation (« digesting ») avant d'initier la production d'agents antimicrobiens. La fusion des vésicules phagosomales, endosomales puis lysosomales est à l'origine de la modification des propriétés physico-chimiques du contenu et de la membrane [107].

En effet, le contenu de la vésicule contenant le microbe ingéré va être acidifié grâce à l'activation des ATPases vacuolaires (V-ATPases) et du complexe NADPH oxydase créant ainsi un environnement hostile au microbe (en raison de l'abaissement du pH=5) [109]. De façon complémentaire, l'acidification du phagolysosome permet une activité optimale de certaines enzymes (protéases et hydrolases acides de type cathepsines) responsables de la digestion du micro-organisme [110].

L'élimination de l'agent pathogène est également favorisée par la production de peptides de type défensines augmentant la perméabilité membranaire et d'autres enzymes (lipases, glycosidases) [35]. Notons que lors de certaines réactions immunitaires plus marquées, ces enzymes microbicides peuvent être libérées dans le milieu extracellulaire et provoquer des lésions tissulaires expliquant pourquoi l'inflammation normalement considérée comme protectrice, provoque parfois des dommages à l'hôte si elle est trop intense ou non régulée.

La dernière étape de la phagocytose repose sur l'acheminement et le chargement des peptides issus de la dégradation microbienne sur les molécules du CMH II en vue d'une présentation des antigènes aux lymphocytes T CD4⁺ [105].

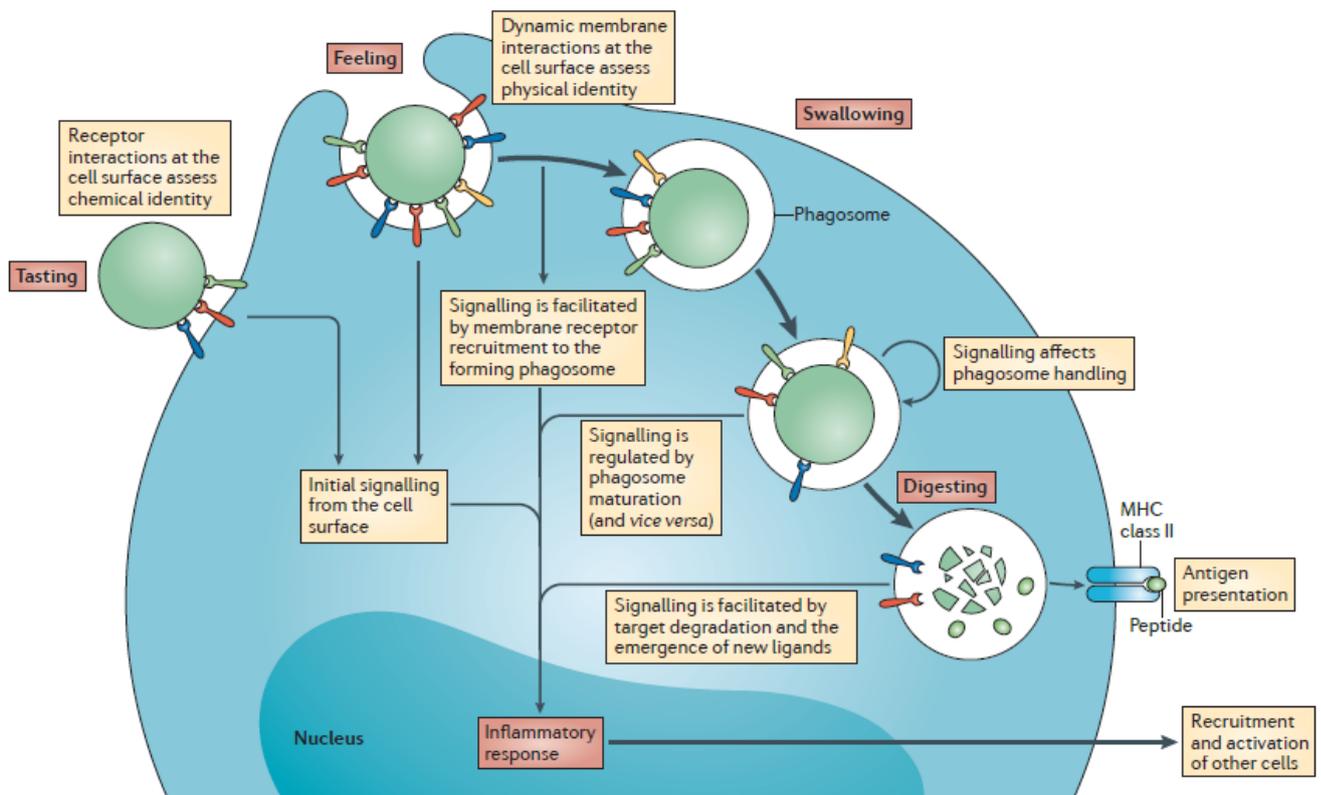


Figure I-13: Les étapes clé de la phagocytose [105].

Au cours de ces différentes étapes résumées dans la Figure I-13, les phagocytes collectent et intègrent les signaux et les informations concernant les propriétés physiques et chimiques des particules captées. Ces informations sont nécessaires à la mise en place d'une réponse immunitaire adaptée à chaque agent. Une étude récente a montré que le macrophage est en mesure de distinguer les bactéries vivantes des bactéries mortes par la détection de « vita-PAMPs » [111]. Lors de la phagocytose de bactéries *Escherichia coli* vivantes, le processus de dégradation de la bactérie vivante libère de l'ARN bactérien qui peut échapper au phagolysosome et être reconnu par les récepteurs cytoplasmiques.

En revanche, comme l'ARN est rapidement dégradé une fois la bactérie tuée, aucune trace d'ARN ou des quantités beaucoup plus faibles sont détectées lors de l'internalisation d'agents tués. Ainsi, alors que certaines réponses immunitaires telles que la production d'IL-6 s'avère commune à la reconnaissance des deux formes de la bactérie, d'autres telles que l'activation de l'inflammasome sont exclusivement initiées après internalisation d'une bactérie vivante. Si la seule activité phagocytaire suffit à éliminer un micro-organisme mort, le succès de l'élimination d'un agent pathogène vivant requiert des actions supplémentaires, et notamment la mise en place d'une réponse adaptative spécifique [105].

La phagocytose, comme d'autres mécanismes, permet donc de détecter le caractère infectieux de l'agent et d'adapter la réponse en conséquence.

Au cours de l'évolution, certains agents pathogènes ont évolué et développé des stratégies de résistance aux mécanismes de l'immunité innée [8]. Par exemple, certaines bactéries intracellulaires comme *Listeria monocytogenes* parviennent à s'échapper des vacuoles phagocytaires grâce à la sécrétion de protéines, et ainsi à coloniser le cytoplasme des cellules. Elles se trouvent ainsi à l'abri des composés microbicides qui acidifient les phagolysosomes. Par ailleurs, les parois de certains microbes résistent à l'action des protéines du complément, alors que d'autres, comme celles des mycobactéries sont composées de lipides inhibiteurs de la fusion des membranes des phagosomes et des lysosomes. Les staphylocoques produisent une enzyme capable de dégrader les espèces réactives de l'oxygène agissant dans les phagolysosomes lors de l'explosion respiratoire.

I.2.2.2.3 L'explosion respiratoire ou « burst oxydatif »

En parallèle des mécanismes d'acidification induits par les enzymes contenues dans le lysosome, le processus de phagocytose et en particulier la fusion des lysosomes et des phagosomes s'accompagne de l'activation de deux complexes enzymatiques capables de générer des molécules dotées d'un pouvoir antimicrobien puissant (Figure I-14). On peut distinguer les intermédiaires réactifs de l'oxygène produits suite à l'activation de la NADPH oxydase (ROIs, Reactive Oxygen Intermediates) et des intermédiaires réactifs de l'azote résultant de l'activation d'iNOS, la NO-synthase inductible.

La NADPH oxydase existe sous forme latente non fonctionnelle dans les phagocytes non activés. En cas d'activation, elle crée un potentiel de membrane qui réduit le dioxygène en anion superoxyde (O_2^-), substrat pour la génération de puissants oxydants tels que H_2O_2 (peroxyde d'hydrogène), OH^- (radical hydroxyle) ou HOCl sous l'action des superoxydes dismutases et des peroxydases [112].

C'est l'explosion respiratoire (« burst oxydatif » ou « hyperactivité oxydative ») qui provoque la peroxydation lipidique et l'oxydation des acides nucléiques et des protéines. Selon certains auteurs, les capacités oxydatives des monocytes seraient plus grandes que celles des macrophages en raison de la baisse du niveau d'expression de la myéloperoxydase au cours de la différenciation des monocytes circulants en macrophages résidents [113].

Le second complexe enzymatique activé, la NO-synthase inductible ou iNOS est impliquée dans la synthèse d'espèces très toxiques comme le monoxyde d'azote (NO^-) généré par le métabolisme de la L-arginine ou les peroxynitrites (ONO_2^-). L'activation des NOS peut être constitutive, transitoire et calcium-dépendante (NOS1 neuronale et NOS2 endothéliale) ou induite par des signaux cytokiniques (iNOS ou NOS2) via $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, IL-2 et IL-8 [114]. Son expression peut également être inhibée par d'autres cytokines ($TGF-\beta$, IL-13 ou IL-4) ou en induisant l'arginase, une enzyme qui entre en compétition avec iNOS pour la L-arginine, ou encore en altérant la stabilité de la protéine. L'induction de NOS2 dans les monocytes/macrophages est aussi complexe et peut faire intervenir différents facteurs de transcription ($NF\kappa B$, IRF-1, AP-1) et messagers secondaires (JAK2/STAT1 α , MAPKs, les protéines kinase Raf-1 et PKC).

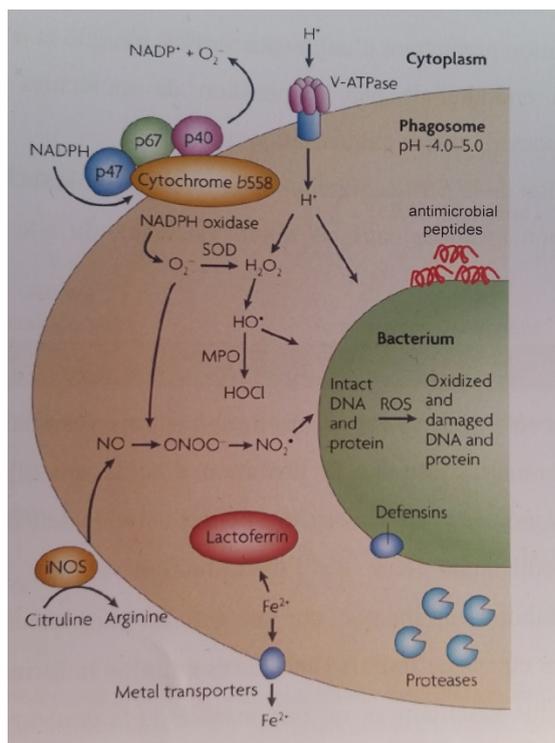


Figure I-14: Les facteurs microbicides du phagocyte professionnel [115].

Lors de la phagocytose, l'hôte met en place des mécanismes moléculaires destinés à dégrader les composés bactériens dont les complexes enzymatiques (NADPH oxydase et NO-synthase inductible ou iNOS), des peptides antimicrobiens et certaines protéines qui favorisent la perméabilisation des parois bactériennes.

I.2.2.3 Réponse inflammatoire et chimiotactisme

I.2.2.3.1 Caractéristiques de l'inflammation

La phagocytose joue un rôle central dans l'induction la réponse inflammatoire. En effet, la reconnaissance et l'internalisation des agents pathogènes par le macrophage entraînent l'activation du facteur de transcription NFκB et la production de médiateurs solubles tels que les cytokines et chimiokines et les médiateurs lipidiques.

Ces médiateurs de l'inflammation favorisent l'attraction des leucocytes sur le site où se développe l'infection, et provoquent également leur activation et leur multiplication dans la moelle osseuse, le but ultime étant de prévenir la dissémination du micro-organisme pour permettre le retour à l'homéostasie et la réparation des tissus lésés. Les macrophages occupent donc une place importante dans l'orchestration de la réponse inflammatoire de l'hôte.

Lors d'une inflammation, l'organisme subit d'importantes modifications vasculaires résumées par quatre signes principaux : 'rubor' (rougeur), 'dolor' (douleur), 'calor' (chaleur) et 'tumor' (gonflement) décrits par le scientifique Celsus il y a 2000 ans [116].

Elles se manifestent par (i) la vasodilatation qui réduit la vitesse des flux sanguin et lymphatique aux abords des tissus lésés, (ii) l'augmentation de la perméabilité vasculaire responsable d'œdème, (iii) l'activation endothéliale par l'augmentation de l'expression de certaines molécules de surface permettant l'attachement et l'infiltration tissulaire des leucocytes, et (iiii) la formation de tissu nécrotique localisé en raison de la coagulation des micro-vaisseaux sur le site infecté, favorisant le confinement de l'infection [12].

I.2.2.3.2 Synthèse de cytokines et chimiokines

Lorsqu'un micro-organisme traverse un épithélium, les macrophages résidents répondent en produisant des protéines solubles qui servent de médiateurs dans de nombreuses réactions immunitaires et inflammatoires (Figure I-15) [8]. Les cytokines et chimiokines (cytokines chimiotactiques) sont la clé de voute des communications entre leucocytes mais également entre les leucocytes et d'autres types cellulaires comme les neutrophiles ou les lymphocytes T lors de la mise en place de la réponse innée ou adaptative (Tableau I-5) [117]. La réponse inflammatoire et notamment la phase cellulaire, peuvent ainsi varier dans le temps en fonction des cytokines produites ou de la modification de l'environnement tissulaire. La sécrétion des cytokines et chimiokines est largement dépendante des conditions de différenciation de la cellule, de son état d'activation et de sa polarisation.

Les cytokines se lient à des récepteurs de haute affinité sur les cellules cibles et peuvent agir de façon autocrine (sur les cellules qui les produisent) ou paracrine (sur les cellules voisines) lorsqu'elles sont sécrétées en petites quantités suite à un stimulus externe. En conditions infectieuses, les macrophages et les cellules dendritiques activés synthétisent des cytokines en grande quantité ; elles sont alors capables d'agir de façon endocrine à distance du site de production. Plusieurs cytokines peuvent avoir des actions similaires (redondance) et une même cytokine peut cibler différents types cellulaires (pléiotropie) [117]. De même, elles peuvent avoir des actions synergiques ou au contraire antagonistes.

Les cytokines se différencient des chimiokines par leurs propriétés fonctionnelles. Les cytokines sont de petites protéines solubles et les chimiokines sont des polypeptides de 8 à 14 kDa.

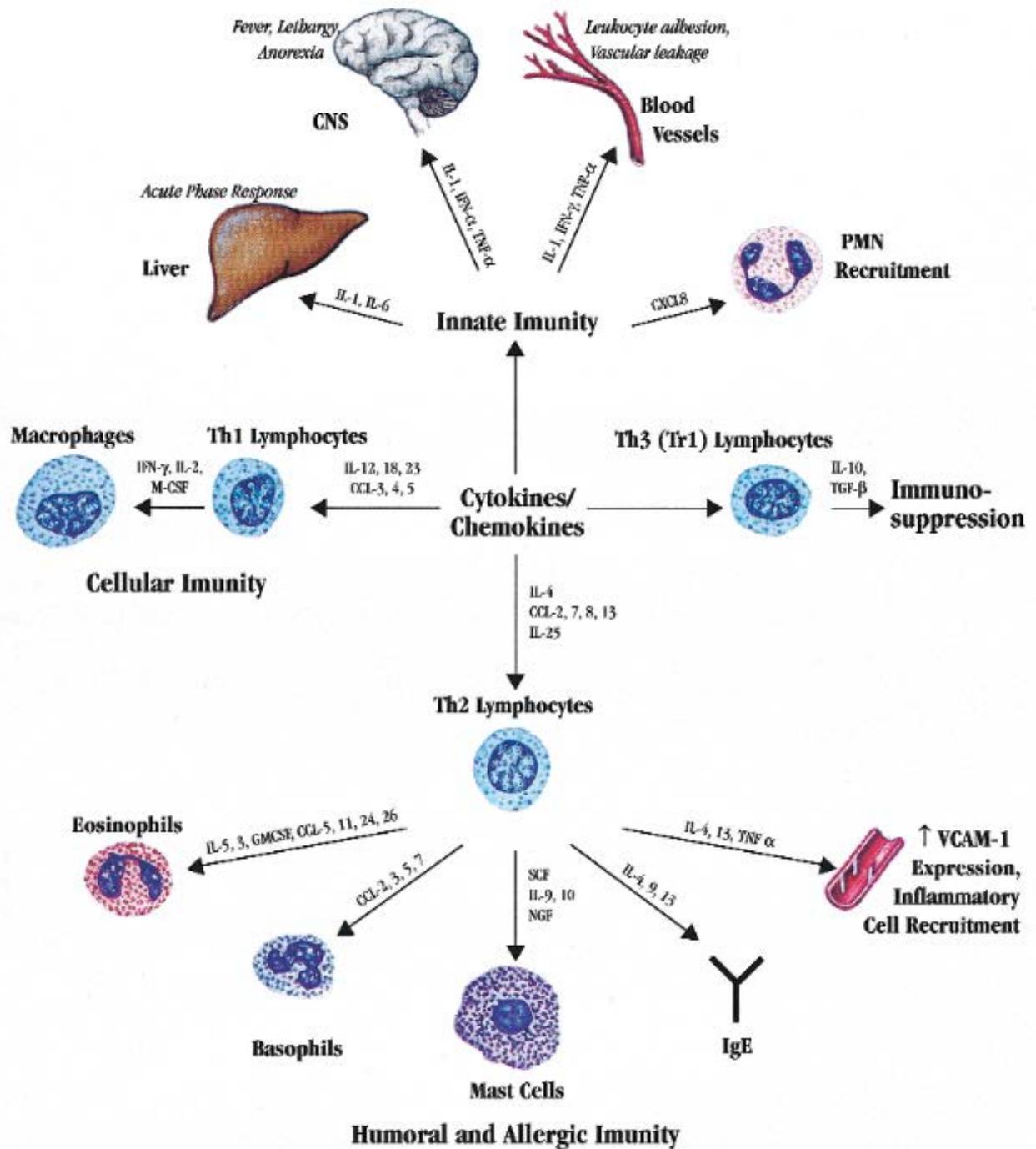


Figure I-15: Les cytokines/chimiokines et leur différents rôles dans la réponse inflammatoire [126].

Les cytokines qui proviennent principalement des phagocytes mononucléés ont un rôle primordial dans l'immunité innée. Elles sont capables d'initier à la fois des réponses immunes variées et de générer des signes biologiques associés à l'infection et autres désordres inflammatoires. Le phénotype de la réponse engagée dépend du panel de cytokines sécrétées par les lymphocytes T auxiliaires qui répondent. Les lymphocytes Th1 sont initialement impliqués dans l'immunité cellulaire et sont caractérisés par leur production d'IFN γ . Les lymphocytes Th2 produisent IL-4, IL-5, IL-9 et IL-13 et contribuent aux réponses humorale et allergique. Finalement le phénotype des T régulateurs montre une tendance claire à l'immunosuppression via la production d'IL-10 et de TGF β .

Cytokines	Principal Source	Primary Activity
GM-CSF	Th cells	Growth and differentiation of monocytes and dendritic cells
IL-1 α	Macrophages and other antigen presenting cells (APCs)	Costimulation of APCs and T cells, inflammation and fever, acute phase response, hematopoiesis
IL- β		
IL-2	Activated Th1 cells, NK cells	Proliferation of B cells and activated T cells, NK functions
IL-3	Activated T cells	Growth of hematopoietic progenitor cells
IL-4	Activated T cells	B cell proliferation, eosinophil and mast cell growth and function, IgE and class II MHC expression on B cells, inhibition of monokine production
IL-5	Th2 and mast cells	Eosinophil growth and function
IL-6	Activated Th2 cells, APCs, other somatic cells	Acute phase response, B cell proliferation, thrombopoiesis, synergistic with IL-1 and TNF on T cells
IL-7	Thymic and marrow stromal cells	T and B lymphopoiesis
IL-8	macrophages, somatic cells	Chemoattractant for neutrophils and T cells
IL-9	T cells	Hematopoietic and thymopoietic effects
IL-10	Activated Th2 cells, CD8+ T and B cells, macrophages	Inhibits cytokine production, promotes B cell proliferation and antibody production, suppresses cellular immunity, mast cell growth
IL-11	Atromal cells	Synergistic hematopoietic and thrombopoietic effects
IL-12	B cells, macrophages	Proliferation of NK cells, IFN production, promotes cell-mediated immune functions
IL-13	Th2 cells	IL-4-like activities
IL-18	Macrophages	potent inducer of interferon- γ by T cells and NK cells
IFN- α	Macrophages, neutrophils and some somatic cells	Antiviral effects, induction of class I MHC on all somatic cells, activation of NK cells and macrophages
IFN- β		
IFN- γ	Activated Th1 and NK cells	Induces of class I MHC on all somatic cells, induces class II MHC on APCs and somatic cells, activates macrophages, neutrophils, NK cells, promotes cell-mediated immunity, antiviral effects
MIP-1 α	Macrophages	Chemotaxis
MIP-1 β	Lymphocytes	Chemotaxis
TGF- β	T cells, monocytes	Chemotaxis, IL-1 synthesis, IgA synthesis, inhibit proliferation
TNF- α	macrophages, mast cells, NK cells, sensory neurons	Cell death, inflammation, pain
TNF- β	Th1 and Tc cells	phagocytosis, NO production, cell death

Tableau I-5: La diversité d'action des cytokines [117].
Monokine, cytokine produite par les monocytes. Tc cells, cellules T cytotoxiques.

Alors que les cytokines constituent des signaux de différenciation et activent une cascade de signalisation intracellulaire (voie JAK-STAT par exemple) et la transcription de gènes en aval de leur récepteur [118], les chimiokines ont un rôle primordial dans le recrutement cellulaire sélectif et dans la mise en place des réponses T des différents types (Th1, 2, 9, 17 et T régulateurs), dont les cellules effectrices présentent des répertoires fonctionnels spécifiques (Figure I-15).

Les macrophages secrètent plusieurs cytokines dites pro-inflammatoires, IL-1 α et β , IL-6, IL-12 et TNF α qui agissent de concert avec les chimiokines CCL2 (MCP-1, Monocyte Chemotactic Protein 1), CCL5 (RANTES, Regulated upon Activation Normal T cell Expressed and Secreted) et CXCL8 (IL-8 chez l'homme). Ce panel de cytokines/chimiokines caractérise un phénotype de type M1 (cf. section *Les différents phénotypes d'activation du macrophage*) et favorisent une réponse T de type 1, caractérisée par ses capacités bactéricide et microbicide [33]. L'IL-12 induit la maturation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th1 en synergie avec l'IL-18 et activent les cellules NK et les lymphocytes CD4⁺ pour la production d'IFN γ , un puissant activateur du macrophage [119]. IL-6, TNF α et IL-1 β stimulent l'expression des molécules d'adhésion à la surface des endothéliums qui deviennent perméables à l'exsudat inflammatoire favorisant ainsi l'adhérence des leucocytes et leur migration. L'IL-6 sollicite la prolifération des lymphocytes B et donc la production d'anticorps, induit la sécrétion de CCL2 responsable du recrutement des monocytes [120], stimule la phagocytose, la cytotoxicité, l'explosion respiratoire et la synthèse de la matrice extracellulaire, mais elle inhibe la synthèse de TGF- β [121].

Les effets d'IL-1 β sont similaires à ceux de l'IL-6, et intègrent également l'activation des lymphocytes T et l'amplification de la réponse inflammatoire induite par TNF α [122].

Chez la souris, les macrophages résidents activés sont également les principaux sécréteurs de CXCL1 (KC) et CXCL2 (MIP-2, Macrophages Inflammatory Protein-2), chimiokines impliquées dans le recrutement des neutrophiles (sous le contrôle de l'IL-8 chez l'homme) [123]. L'interféron de type I (IFN α), spécifique de la réponse antivirale fait également partie du panel des cytokines produites par les macrophages ; il augmente l'expression des molécules de CMH I et active les cellules NK [8].

A noter qu'il existe une réponse de type Th17, distincte de Th1/Th2, qui assure la mise en place d'une réponse antifongique notamment via la production d'IL-23, initiée par IL-6 et TGF- β [124]. Les macrophages, en tant qu'orchestrateurs de l'immunité innée sont également impliqués dans la régulation et la résolution de l'inflammation, notamment les macrophages de type M2 qui engagent la réponse T de type 2. L'IL-10 et le TGF- β sont deux exemples de cytokines immuno-régulatrices qui inhibent la production d'IFN γ et d'IL-2 par les cellules Th1 ainsi que la transcription des gènes du complexe NADPH oxydase [125]. TGF- β active la régénération tissulaire médiée par la prolifération des fibroblastes mais inhibe la division des L_T et L_B [102].

Les cytokines Th2, IL-4 et IL-13 induisent les macrophages de type M2. Ces notions seront précisées dans la section correspondante.

I.2.2.3.3 Production de médiateurs lipidiques

Le macrophage est également capable de synthétiser des médiateurs lipidiques de l'inflammation tels que les éicosanoïdes. Chez les mammifères, le précurseur majeur des éicosanoïdes est l'acide arachidonique (AA), un acide gras polyinsaturé contenant 20 atomes de carbone. Il est libéré à la suite de la dégradation des phospholipides membranaires sous l'action de la phospholipase A2 (PLA2) [127]. Il est ensuite métabolisé par deux voies principales, celle des cyclo-oxygénases (COX) et celle des lipoxygénases (Figure I-16).

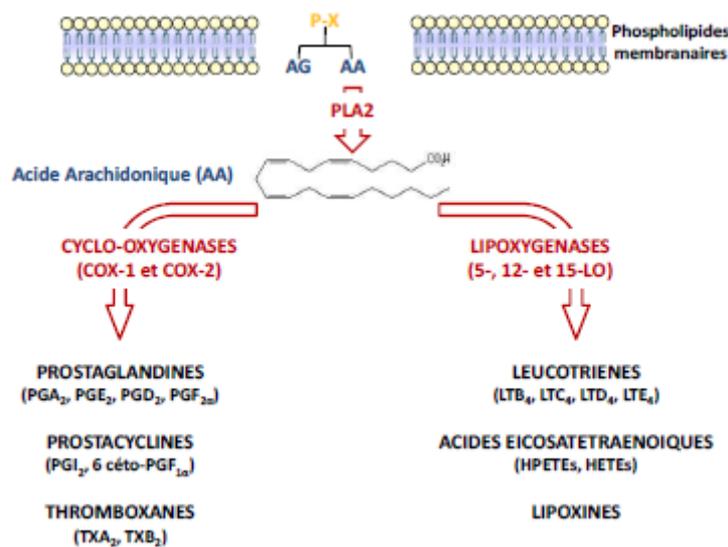


Figure I-16: Les voies de métabolisme de l'acide arachidonique (d'après [128]).

Les prostanoides représentés par les prostaglandines (PG) et les thromboxanes (TX) sont issus de l'activation de la voie COX et jouent un rôle important dans les modifications vasculaires. Alors que les PG favorisent la vasodilatation artérielle et l'augmentation de la perméabilité membranaire, et inhibent l'agrégation plaquettaire, les TX induisent la vasoconstriction et l'agrégation des plaquettes [129]. Aux doses physiologiques, les PG renforcent l'action perméabilisante des bradykinines et de l'histamine qui sont produites en cas de lésion vasculaire. Les PG sont produites par les monocytes/macrophages suite à un signal infectieux, physique (chaleur, UV) ou chimique (acide, urée), produit par une bactérie ou une levure

pathogène (*Candida albicans*), ou inflammatoire et peuvent moduler l'expression de certains gènes pro- ou anti-inflammatoires.

Contrairement aux PG, les leucotriènes (LT) sont produits par un nombre restreint de types cellulaires dont les monocytes/macrophages et les mastocytes. Les LT sont produits suite à l'activation des lipoxgénases et conduisent également à la vasoconstriction, la perméabilisation des veinules et par conséquent l'adhésion des leucocytes à l'endothélium [129]. Les LT sont d'importants médiateurs de l'accumulation des leucocytes lors de la phase aiguë de l'inflammation. Alors que le LTB₄ est un puissant chimio-attractant des neutrophiles, le LTC₄ est impliqué dans les réactions allergiques.

D'autre part, certains métabolites issus de l'oxygénation de l'AA contribuent également à la résolution de l'inflammation, par leur action inhibitrice du facteur de transcription NFκB entre autres [130]. Cette question sera abordée dans la section correspondante, *Régulation de l'inflammation et retour à l'homéostasie*.

I.2.2.4 Recrutement leucocytaire

Suite à la reconnaissance de signaux de danger exogènes (bactérie, DAMPS), les macrophages résidents s'activent et libèrent des cytokines (principalement TNFα et IL-1β) et des chimiokines qui augmentent la perméabilité membranaire des cellules endothéliales. Les molécules d'adhésion, les sélectines exprimées à la surface des endothéliums sont modifiées pour permettre l'extravasation des phagocytes circulants qui vont à leur tour sécréter des cytokines et des chimiokines, et amplifier ainsi la réponse inflammatoire.

L'extravasation des phagocytes circulants (neutrophiles et monocytes) se déroule suivant quatre étapes distinctes détaillées dans la Figure I-17 [131,132] :

(i) le « rolling » ou roulement des leucocytes sur l'endothélium grâce aux sélectines (en état de faible affinité) et aux intégrines. Les leucocytes s'activent en présence des chimiokines sécrétées dans l'environnement cellulaire

(ii) l'« arrest » ou la phase d'arrêt grâce à l'établissement de liaisons fortes entre les intégrines exprimées sur les cellules et leurs ligands présents sur les cellules endothéliales. L'adhérence des leucocytes sur les endothéliums est alors stable

(iii) la « transmigration » ou diapédèse des leucocytes qui correspond au passage des leucocytes à travers la paroi endothéliale. Les membranes cellulaires subissent un changement de conformation et forment des protrusions.

L'interaction d'ICAM-1 (Intracellular Adhesion Molecule-1) et de Mac1 (Macrophage Antigen 1) est associée à l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire et à l'activation de MAPK p38, conduisant à l'augmentation de la contractilité des cellules endothéliales. Cela favorise ainsi la transmigration des leucocytes qui pénètrent à l'intérieur des parties fines des corps des endothéliums (voie transcellulaire) ou des jonctions intercellulaires (voie paracellulaire)

(iv) et enfin la migration intra-tissulaire des leucocytes incluant la traversée des cellules basales de l'endothélium et la couche de péricytes sous-jacente via les interstices et suivant un gradient de chimiokines fixées aux protéoglycanes de la matrice extracellulaire (fibrine et fibronectine).

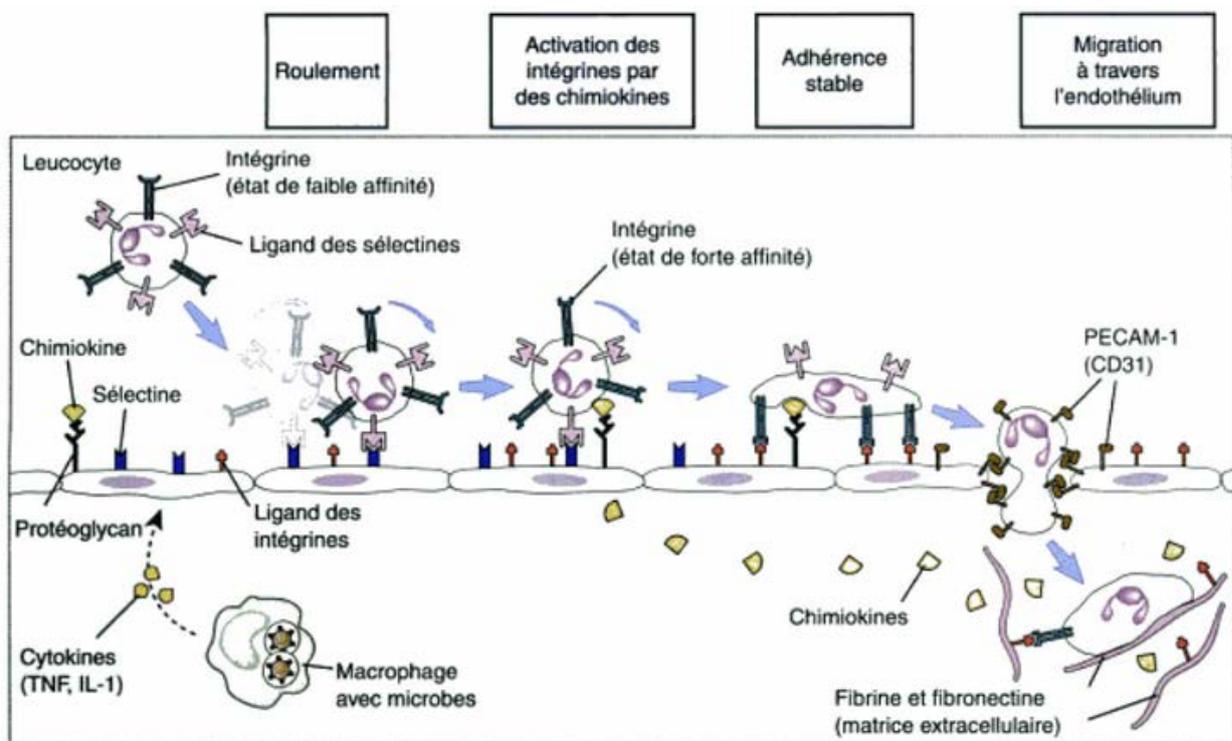


Figure I-17: Cascade des événements de la migration des leucocytes circulants vers les foyers infectieux [8].

Les neutrophiles et les monocytes se basent sur le même mécanisme de migration. PECAM-1, platelet-endothelial cell adhesion molecule-1.

Comme décrit dans une section précédente (*Synthèse de cytokines et chimiokines*), les chimiokines jouent un rôle central dans le recrutement des leucocytes circulants. Elles modifient et préparent les endothéliums à l'adhérence et à la migration des leucocytes vers les sites infectieux, ainsi que l'environnement physico-chimique de la matrice extracellulaire grâce aux gradients de concentration que suivent les leucocytes.

Ces molécules disposent également d'un pouvoir de sélection crucial puisque le type cellulaire recruté dépend de la chimiokine libérée. Ceci autorise par conséquent un contrôle temporel du recrutement des cellules inflammatoires.

Suite à un stimulus, les macrophages résidents produisent des médiateurs de l'inflammation dont CXCL1 et CXCL2, CXCL5 et CXCL8, impliqués dans le recrutement initial des granulocytes neutrophiles [131,133]. Ce recrutement initial est soutenu par la libération de G-CSF (Granulocyte Colony Stimulated Factor) responsable de la libération des neutrophiles dans la circulation sanguine à partir de la moelle osseuse [133–135]. Lors du passage des neutrophiles à travers l'endothélium, ils libèrent des protéines granulaires, des médiateurs préformés auxquels sont sensibles les monocytes circulants. Les neutrophiles nouvellement recrutés induisent également la production de CCL2, CCL7, CCL5 et CCL3, qui sont de puissants chimio-attractants des monocytes inflammatoires [136].

1.2.2.4.1 Granulocytes neutrophiles

Les premières cellules à être mobilisées sur le site de l'infection sont les granulocytes neutrophiles (GNN), ils sont recrutés sous l'action des chimiokines CXCL1, CXCL2 et CXCL8 [134]. Ils sont chargés d'organiser séquentiellement le recrutement de différents types de leucocytes sur les sites enflammés grâce à leur pouvoir sécrétoire et chimiotactique [137]. Avec $1 \text{ à } 2 \times 10^{11}$ neutrophiles produits par jour chez l'homme adulte à l'état sain, la synthèse de neutrophiles représente quantitativement l'activité la plus importante de la moelle osseuse – les 2/3 de l'hématopoïèse étant consacrés à la myélopoïèse (granulocytes et monocytes) [134].

Ils sont rapidement mobilisables mais ont une durée de vie limitée de quelques heures à un jour suivant les conditions, et meurent suivant un programme d'apoptose spontanée ou plus rarement au cours de la réponse antimicrobienne [138]. Une fois activés, les GNN possèdent de puissantes capacités phagocytaires et bactéricides notamment grâce aux différents types de granules présents dans leur cytoplasme ou suite à l'activation du métabolisme de la NADPH oxydase [131,139] (Figure I-18). Les granules cytoplasmiques qui caractérisent les granulocytes (éosinophiles, basophiles, neutrophiles), contiennent de nombreux facteurs protéiques (plus de 300 par granules), en grande majorité des protéases capables dégrader les micro-organismes ou de digérer les tissus.

Lors de la phagocytose des particules, les granules sont dirigés vers les phagosomes. En revanche, en cas d'interaction non directe avec l'agent en question (détection du TNF α par exemple), les granules libèrent leur contenu dans le milieu extracellulaire pour créer un environnement défavorable aux agents pathogènes à proximité [138].

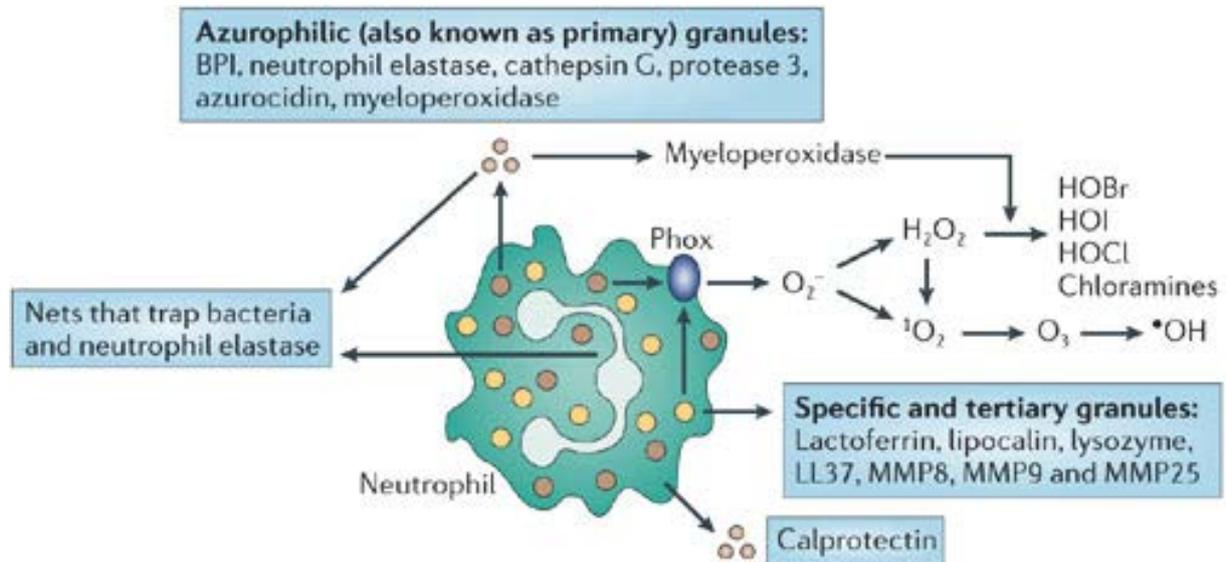


Figure I-18: La diversité des molécules antimicrobiennes produites par les neutrophiles [140].

Les agents microbicides sont séquestrés dans différents compartiments cytoplasmiques du neutrophile : les granules azurophiles (primaires), les granules spécifiques (secondaires) et les granules tertiaires, le plasma et les membranes phagosomales, le noyau et le cytoplasme. BPI, bactericidal permeability increasing protein; H_2O_2 , peroxyde d'hydrogène; HOBr, acide hypobromique; HOCl, acide hypochlorique; HOI, acide hypoiodique; MMP, matrix metalloproteinase; phox, phagocyte oxydase; 1O_2 , singulet de l'oxygène ; O_2^- , superoxyde ; O_3 , ozone ; $\cdot OH$, radical hydroxyl.

Les granules sont classés en trois sous-ensembles caractérisés par les marqueurs cellulaires et qui agissent selon un ordre hiérarchique défini [141,142]:

- (i) les vésicules sécrétrices qui libèrent leur contenu (albumine ; HBP, Heparin Binding Protein) au contact des endothéliums
 - (ii) les granules tertiaires (ou gélatinase) contenant gélatinase, lactoferrine, lysozyme et des enzymes dégradants la matrice (MMP9) sont mobilisés lors de la transmigration
- et enfin,
- (iii) les granules primaires ou azurophiles riches en myéloperoxydase, élastase, cathepsine et lysozyme, et granules secondaires (ou spécifiques) riches en lactoferrine et en lysozyme qui sont libérés dans le site lésé.

Les GNN ne contiennent pas seulement des granules protéiques pour une réponse immédiate. Ils expriment aussi un large panel de cytokines, chimiokines et autres récepteurs pour la différenciation et la reconnaissance des cytokines/chimiokines produites par d'autres types cellulaires (monocytes, macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes T) favorisant un dialogue efficace entre immunité innée et adaptative. L'ensemble des mécanismes bactéricides déployés par le neutrophile a pour but l'éradication des agents pathogènes phagocytés.

Les neutrophiles constituent ainsi la population anti-infectieuse de l'hôte de premier rang (Figure I-19).

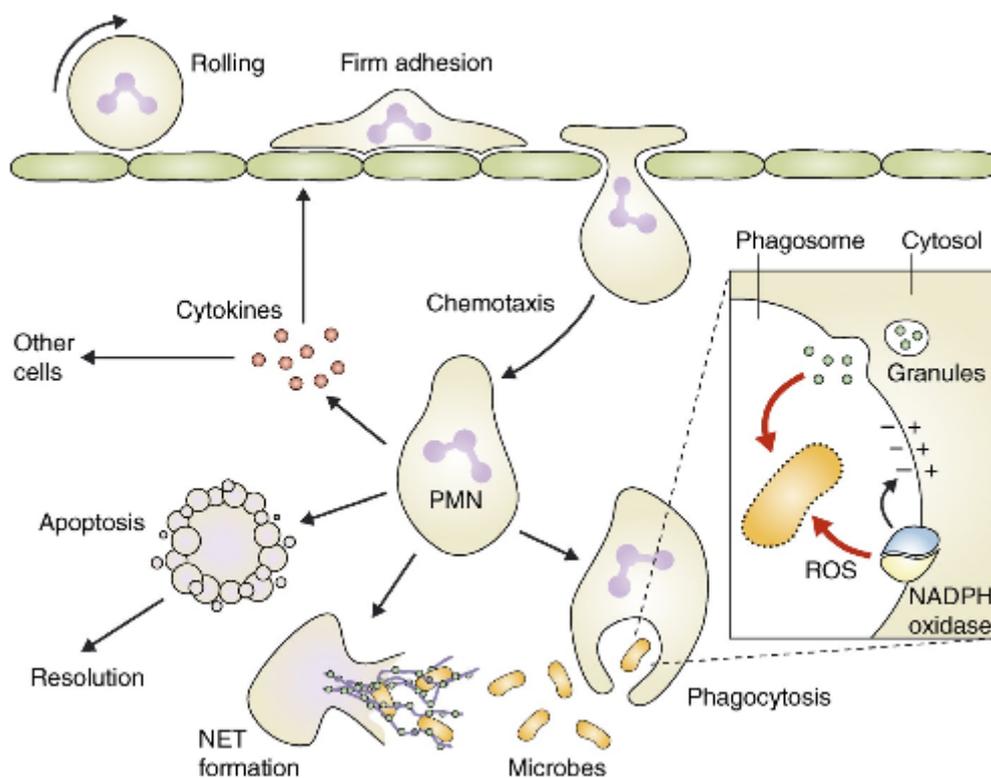


Figure I-19: Les fonctions du neutrophile [138].

Après leur migration vers le site d'inflammation, les neutrophiles (GNN) phagocytent et digèrent les agents pathogènes, sécrètent de NETs (Neutrophils Extracellular Traps) qui piègent les bactéries, et produisent des cytokines qui contribuent à la réponse inflammatoire. Une fois l'infection maîtrisée, les neutrophiles meurent par apoptose et induisent un programme de résolution de l'inflammation. La clairance bactérienne intervient dans les phagosomes grâce aux ROS générés par la NADPH oxydase qui provoque la dépolarisation de la membrane phagosomale, requise pour la mise en place d'un environnement optimal dans le phagosome.

I.2.2.4.2 Monocytes

La diapédèse des neutrophiles vers le site inflammatoire est suivie d'une seconde vague de recrutement de monocytes inflammatoires [143]. Les monocytes représentent 5 à 10% des leucocytes du sang périphérique chez la souris et chez l'homme. Leur durée de vie dans le sang est relativement courte, d'un jour chez la souris à trois jours chez l'homme. Ils proviennent de précurseurs myéloïdes de la moelle osseuse, circulent dans le compartiment sanguin puis migrent dans les tissus lésés suite au signal émis par les neutrophiles activés, notamment à la chimiokine, CCL2 [16,136].

Les différentes sous-populations de monocytes sanguins se distinguent par l'expression des récepteurs des chimiokines et la présence de molécules de surface spécifiques, notamment Ly6C chez la souris [19] ; ils exercent des fonctions distinctes (Tableau I-6). Chez la souris, les monocytes sanguins sont identifiés initialement par l'expression de CD11b et CD115, ainsi que par l'expression de l'antigène F4/80.

Chez la souris, les monocytes dits « inflammatoires » (ou Ly6C^{hi} ou GR1⁺) expriment un niveau élevé de CCR2 (CC-chemokine receptor 2), mais faible de CX₃CR1 (CX₃C-chemokine receptor 1). Ils sont rapidement recrutés sur le site inflammatoire de façon dépendante de CCR2 (via CCL2 et CCL20), mais indépendante des signaux provenant de CX₃CR1. Ils ont un rôle pro-inflammatoire et bactéricide [143]. Ils partagent des caractéristiques communes avec les monocytes humains CD14⁺⁺CD16⁻ dits « classiques ». En revanche, les monocytes dits « résidents » (ou Ly6C^{low} ou Gr1⁻) expriment fortement CX₃CR1 mais faiblement CCR2 et Ly6C, persistent plus longtemps dans le sang et les tissus et sont de plus petite taille et moins granulaires. Ils sont apparentés aux monocytes humains CD14⁺CD16⁺⁺ dits « non classiques ». Ils sont impliqués dans des fonctions ayant trait à la réparation tissulaire, à la veille et au remplacement des macrophages ou de cellules dendritiques résidents à l'état sain [143].

Subset	Markers	Chemokine receptors	Functions
<i>Mouse</i>			
LY6C ^{hi}	CD11b ⁺ CD115 ⁺ LY6C ^{hi}	CCR2 ^{hi} CX ₃ CR1 ^{low}	Pro-inflammatory ⁷ and antimicrobial ⁹ roles
LY6C ^{low}	CD11b ⁺ CD115 ⁺ LY6C ^{low}	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Patrolling ¹¹ ; early responses ¹¹ ; tissue repair ¹²⁸
<i>Human</i>			
Classical	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁻	CCR2 ^{hi} CX ₃ CR1 ^{low}	Resemble LY6C ^{hi} monocytes based on gene-expression arrays ^{7,17,140}
Intermediate	CD14 ⁺⁺ CD16 ⁺	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Pro-inflammatory roles ^{12,15}
Non-classical	CD14 ⁻ CD16 ⁺⁺	CX ₃ CR1 ^{hi} CCR2 ^{low}	Patrolling ¹⁴ ; antiviral roles ¹⁴

CCR2, CC-chemokine receptor 2; CX₃CR1, CX₃C-chemokine receptor 1.

Tableau I-6: Les différentes sous-populations de monocytes sanguins [136].

Le recrutement des monocytes inflammatoires Ly6C^{hi} s'opère selon un processus qui est intégralement coordonné par les neutrophiles [144]. Lors de leur activation, les neutrophiles attachés par les protéoglycanes des cellules endothéliales libèrent le contenu de leurs granules protéiques. Ces dernières sont reconnues par les monocytes qui roulent à la surface de l'endothélium puis y adhèrent fermement suite à l'augmentation de l'expression de certaines molécules de surface (ICAM-1 et VCAM-1, Vascular Cell Adhesion Molecule-1). L'azurocidine (HBP), LL-37 (cathelicidine ou hCAP18, Human Cationic Antimicrobial Protein 18) et la cathepsine G libérés par les neutrophiles (vésicules sécrétrices) activent les récepteurs formyl peptide (fMLPR) présents sur les monocytes inflammatoires, ce qui favorise leur extravasation tissulaire. Les neutrophiles synthétisent des complexes solubles IL-6/IL-6R qui activent les cellules endothéliales via le récepteur transmembranaire gp130 (Glycoprotein 130) et la production de CCL2, un puissant chimio-attractant des monocytes.

Une fois libérées, les protéines des granules induisent la synthèse de chimiokines *de novo* par les macrophages et les cellules endothéliales avoisinantes, notamment CCL3, CCL6, CCL9, CCL15, CCL20 et CCL23, qui attirent les monocytes.

Les monocytes se différencient en macrophages dès leur entrée dans le tissu et collaborent avec les neutrophiles notamment pour la phagocytose ou encore la production de cytokines/chimiokines (Figure I-20). Les macrophages prennent également en charge les neutrophiles apoptotiques, ce qui marque le début de la phase de résolution de l'inflammation, indispensable pour prévenir des dommages tissulaires excessifs et initier le processus de cicatrisation.

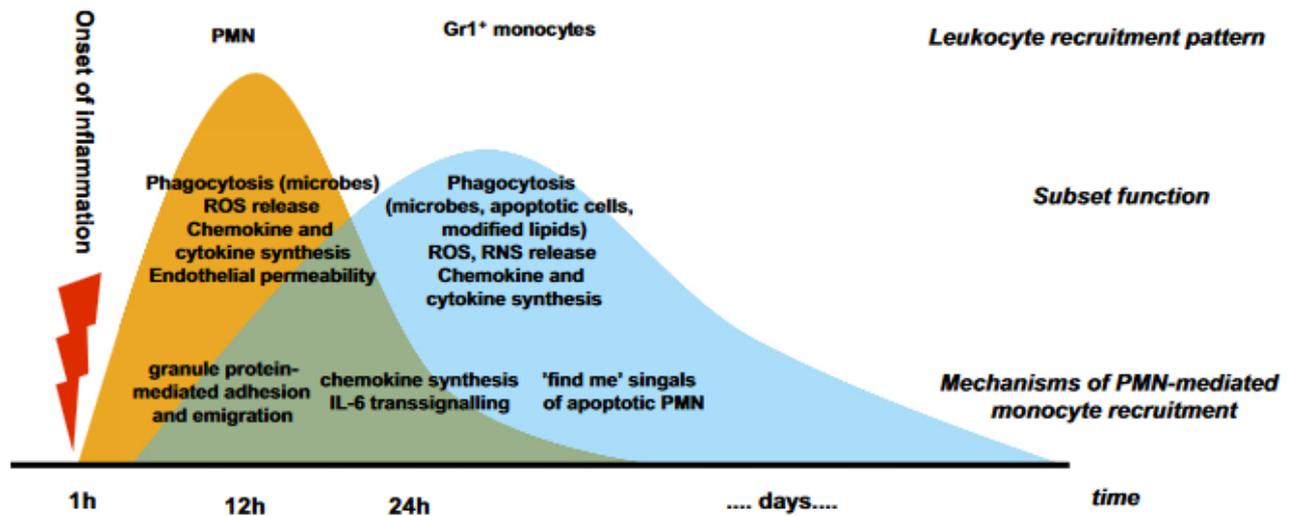


Figure I-20 : Vue intégrée du partenariat Neutrophiles/Monocytes lors de l'inflammation [143].

Les neutrophiles sont rapidement recrutés dans le site inflammatoire et leurs granules protéiques induisent le recrutement des monocytes sanguins. Les mécanismes mettant en jeu la synthèse de chimiokines et de molécules d'adhésion *de novo* sont mis en place tardivement. Finalement, les signaux générés par les neutrophiles apoptotiques attirent les monocytes. Ainsi l'axe PMN/ Monocytes permet une réponse inflammatoire optimale.

I.2.2.5 Régulation de l'inflammation et retour à l'homéostasie

La résolution de l'inflammation est un processus complexe caractérisé par l'élimination des neutrophiles apoptotiques, l'inhibition ou l'arrêt de l'infiltration neutrophilique et le maintien du recrutement des monocytes [131] (Figure I-21). En effet, la réponse inflammatoire est indispensable à l'éradication des agents pathogènes mais elle n'est pas sans conséquence pour l'hôte qui subit des dommages tissulaires parfois sévères. Il est donc impératif de stopper cette réaction inflammatoire pour restaurer l'intégrité tissulaire et assurer le retour à l'homéostasie.

Souvent considérés comme inactifs dans cette phase ultime, les neutrophiles jouent un rôle non négligeable dans l'induction de la résolution de l'inflammation. En effet, lors de l'étape finale, les neutrophiles subissent un « switch » du métabolisme des éicosanoïdes depuis la production de leucotriène B4 vers la production de lipoxine A4.

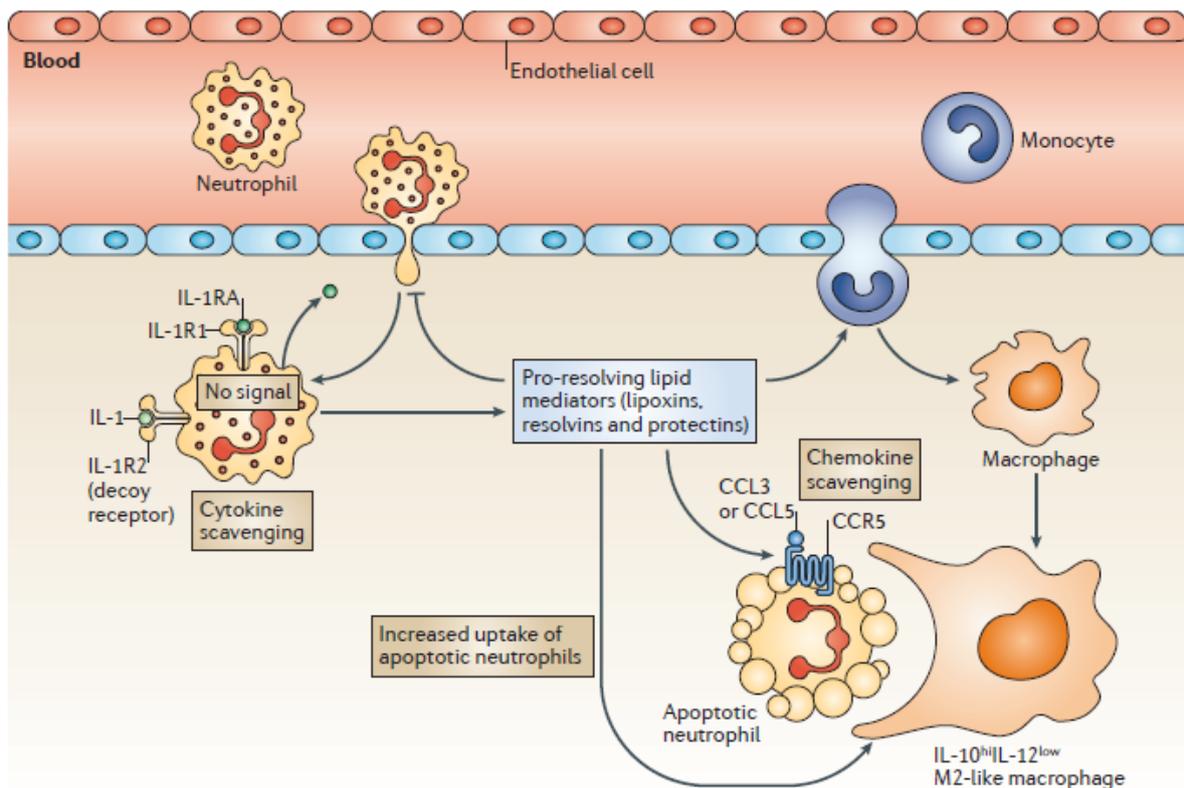


Figure I-21: Les interactions phagocytaires lors de la résolution de l'inflammation [145].

Les neutrophiles orchestrent la phase de résolution de l'inflammation via différents mécanismes parmi lesquels la séquestration des cytokines/chimiokines et la synthèse de médiateurs lipidiques pro-résolutifs (résolvines, protectines, lipoxines). Ces médiateurs lipidiques pro-résolutifs stoppent l'infiltration neutrophilique et promeuvent l'ingestion des neutrophiles apoptotiques par les macrophages. Ils augmentent également l'expression de CCR5 sur les PMN apoptotiques ce qui permet la séquestration et la clairance de CCL3 et CCL5. IL-1RA (qui se lie et inhibe IL-1R1), dérivé des neutrophiles et IL-1R2 (qui piège IL-1) sont des mécanismes additionnels pour limiter les effets pléiotropiques de l'IL-1.

Les lipoxines (LX) issues de l'activation de PGE2, sont responsables de l'arrêt du recrutement des neutrophiles sur le site infecté, de la prise en charge des neutrophiles apoptotiques par les macrophages et de la régulation de l'action de l'histamine [131], alors que le recrutement des monocytes est maintenu. Les neutrophiles peuvent également contribuer à la synthèse d'autres médiateurs lipidiques pro-résolutifs, les résolvines et les protectines générés à partir d'acides gras polyinsaturés essentiels (oméga-3). Ces lipides résolutifs et plus récemment les marésines (dérivés des macrophages) sont impliqués dans des fonctions régulatrices en inhibant la transmigration des neutrophiles à travers l'endothélium et leur infiltration tissulaire. Ils contribuent ainsi à la résolution de la réponse inflammatoire [130,146].

Il semble donc que l'AA soit à l'origine de différents métabolites lipidiques qui se relaient tout au long du processus inflammatoire permettant ainsi d'induire et de résoudre l'inflammation, mais également d'initier la phase de réparation tissulaire (Figure I-22).

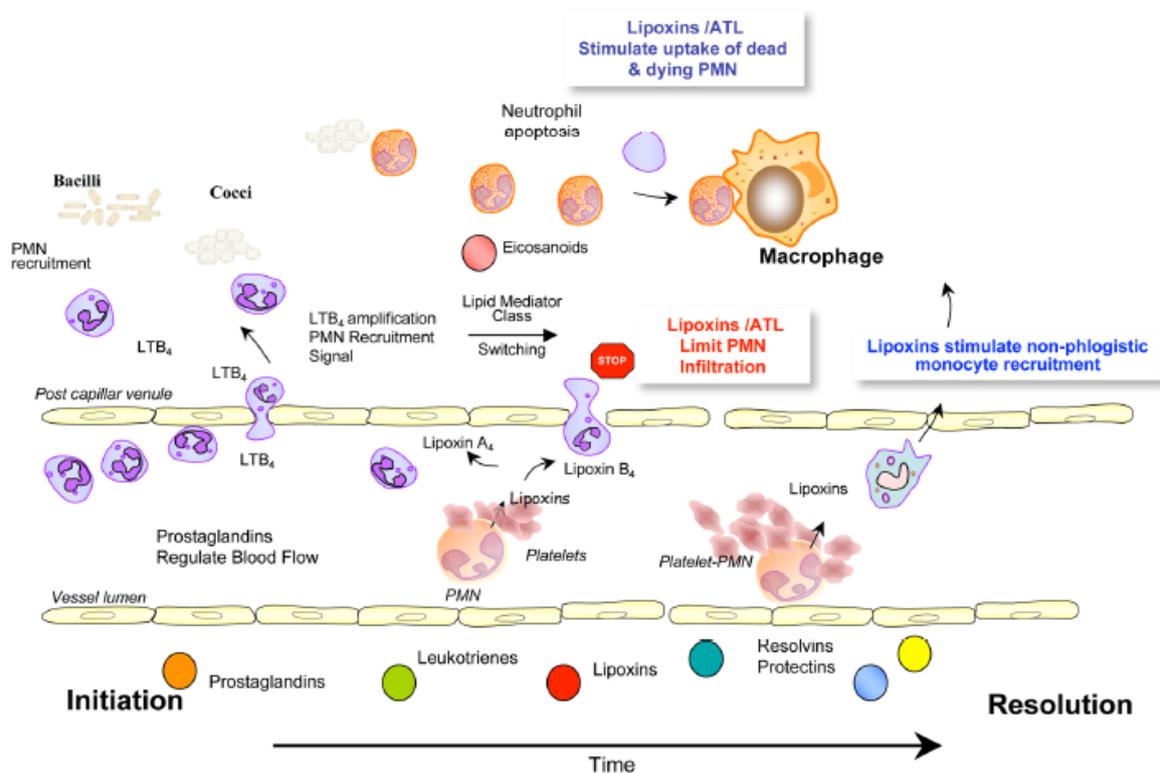


Figure I-22: Les médiateurs lipidiques et leur rôle dans l'inflammation [148].

La contribution des neutrophiles à la phase de résolution inclut également la séquestration des chimiokines attirant les neutrophiles. Les médiateurs lipidiques anti-inflammatoires (lipoxines, résolvines et protectines) favorisent l'expression de CCR5 (CC-chemokine receptor 5) par les neutrophiles apoptotiques qui peuvent alors capturer et séquestrer CCL3 et CCL5, qui sont leurs ligands [147,148]. Les neutrophiles expriment également la CC-chemokine D6 qui a le pouvoir de séquestrer toutes les chimiokines inflammatoires de type CC [145]. Cette capacité réduit donc fortement l'influx neutrophilique tardif. De plus, les glucocorticoïdes augmentent le niveau d'expression IL-1R2, un leurre pour l'IL-1, qui ne peut donc plus interagir avec IL-1R1, son récepteur à la surface des neutrophiles. En parallèle, ce dernier est détourné par IL-1RA, un facteur soluble produit par le neutrophile ayant été au contact de l'IL-10, cette interaction n'induisant aucun signal. La production et l'expression de ces leurre permettent donc de limiter les effets pro-inflammatoires de l'IL-1 sur les neutrophiles.

L'élimination des neutrophiles apoptotiques est une étape clé de cette phase. Ils émettent des signaux dits « eat me » notamment l'exposition des résidus phosphatidyl sérine sur leur membrane qui facilitent leur reconnaissance, leur phagocytose et le déclenchement d'un programme anti-inflammatoire par les macrophages [149].

De même, ces résidus interagissent avec les récepteurs scavenger des macrophages favorisant ainsi l'élimination des corps apoptotiques [98].

L'élimination des neutrophiles apoptotiques (efferocytose) est indispensable pour (i) prévenir la lyse cellulaire (nécrose secondaire) et donc la libération de composés intracellulaires toxiques qui pourraient endommager les tissus, et (ii) promouvoir la réponse anti-inflammatoire par la production d'IL-10 et de TGF- β qui favorisent la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire [150]. L'efferocytose induit une modification du profil transcriptionnel du macrophage d'un phénotype pro-inflammatoire de type M1 à un phénotype anti-inflammatoire de type M2, notamment via l'action autocrine d'IL-4 (production endogène) et d'IL-13 (cf. section *Les différents phénotypes d'activation du macrophage*).

Le macrophage ayant internalisé le neutrophile apoptotique quitte le site de l'inflammation pour rejoindre le flux lymphatique vers les nœuds lymphatiques où il dégénère. Dans ces conditions, l'homéostasie tissulaire peut être à nouveau rétablie.

1.2.2.6 Les différents phénotypes d'activation du macrophage

Les macrophages sont des cellules caméléons qui adaptent leur phénotype à leur microenvironnement et aux signaux qu'ils perçoivent. Ils sont caractérisés par leur grande diversité et leur plasticité hors norme [151]. En contexte infectieux, les macrophages résidents s'activent et la production de cytokines/chimiokines et d'autres médiateurs de l'inflammation augmente au même titre que le recrutement des monocytes. Notamment, les facteurs de croissance GM-CSF et M-CSF sont impliqués dans la différenciation des monocytes en macrophages [152]. Lorsque l'immunité adaptative se met en place, les lymphocytes T créent un environnement cytokinique qui conduit à la polarisation des macrophages.

La polarisation des macrophages a initialement été divisée en deux phénotypes qui sont le symétrique de la nomenclature Th1/Th2 appliquée aux lymphocytes T CD4 : (i) les macrophages M1, pro-inflammatoires qui sont induits par les cytokines associées au type 1, IFN γ et TNF α ou encore un stimulus bactérien (LPS), et (ii) les macrophages M2, anti-inflammatoires qui sont induits par les cytokines de type 2, IL-4 et IL-13 [33,153]. L'activation dite « classique » conduit aux macrophages M1 qui assurent l'initiation et le maintien de l'inflammation et ont un rôle majeur dans la résistance aux infections.

Par opposition, les macrophages M2 caractérisent différentes formes d'activation autre que la forme classique. Ils sont de phénotypes hétérogènes (trois sous-phénotypes), résultant d'une activation dite « alternative » ; ils sont impliqués dans des fonctions de régulation de l'inflammation, de réparation tissulaire et de retour à l'homéostasie. Il convient toutefois de préciser que les stades d'activation M1 et M2 apparaissent comme les extrémités d'un continuum de formes d'activation du macrophage, caractérisées par un panel de récepteurs et de propriétés fonctionnelles qui dépendent du microenvironnement [151] (Figure I-23).

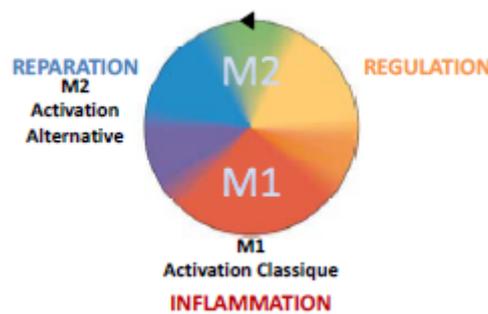


Figure I-23: Le spectre d'activation des macrophages [151].

En raison de leur hétérogénéité, les macrophages M2 peuvent être divisés en trois sous-populations : M2a, M2b et M2c qui se distinguent par un profil d'expression particulier [33] (Figure I-24). Le sous-type M2a est induit par les cytokines IL-4 et IL-13, M2b par des ligands de IL-1R ou suite à l'exposition à des complexes immuns et au LPS, et enfin le sous-type M2c qui est induit par l'IL-10, le TGF- β ou des hormones glucocorticoïdes. Un quatrième type de macrophage, caractérisé par un profil M2 IL-10^{high}IL12^{low} et nommé M2d, possède des propriétés communes aux macrophages associés aux tumeurs (ou TAM) et diffèrent des M2a-c [154].

Le phénotype des macrophages est en outre plastique et ces cellules peuvent subir une repolarisation complète de M2 à M1, et vice versa, en réponse aux changements de leur environnement cytokinique [155]. Cette inversion de phénotype est rapide et effective à différents niveaux : expression des gènes, synthèse des protéines et des métabolites, activité microbicide.

Classically activated
macrophages
M1

Alternatively activated
macrophages
M2

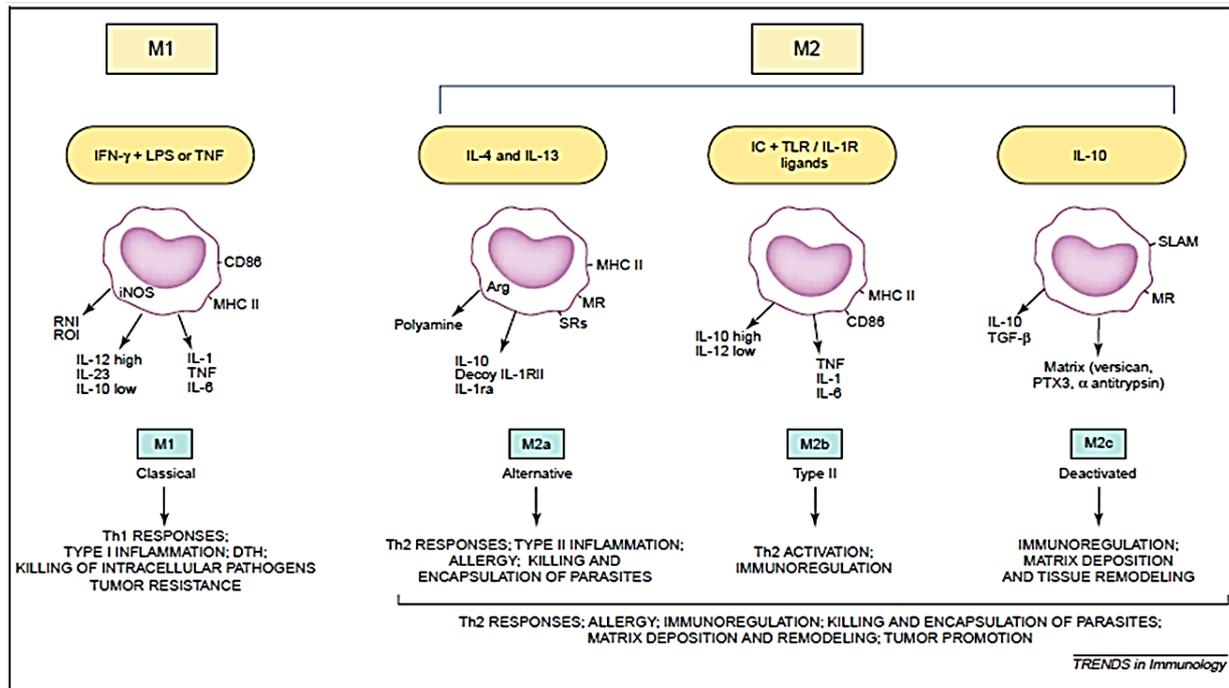


Figure I-24: Les propriétés fonctionnelles et les inducteurs des différents phénotypes d'activation du macrophage. D'après [33].

Les macrophages se polarisent et acquièrent des propriétés fonctionnelles différentes en réponse aux signaux délivrés par l'environnement extérieur. L'exposition des macrophages à l'IFN γ et au LPS induit la polarisation M1, acquérant des propriétés cytotoxiques et anti-tumeur, alors que les macrophages M2 sont en général immuno-régulateurs et possèdent une activité pro-tumorale. En particulier, M2a (induit par IL-4 et IL-13) et M2b (induit par l'association de complexes immunitaires et d'agonistes TLR ou d'IL-1R) exercent des fonctions immuno-régulatrices et entraînent des réponses Th2, alors que les M2c (induit par IL-10) sont impliqués dans les programmes de suppression de réponses immunitaires et le remodelage des tissus. DTH, delayed-type hypersensitivity; IC, immune complexes; MR, Mannose Receptor; PTX3, the long pentraxine PTX3; RNI, reactive nitrogen intermediates; SLAM, signaling lymphocytic activation molecule.

I.2.3 Rôle dans l'immunité acquise

I.2.3.1 Cellules présentatrices d'antigènes

Outre son implication cruciale dans l'élimination précoce des agents pathogènes, le macrophage est aussi un acteur-clé de la transmission de signaux d'alerte au volet adaptatif de la réponse immunitaire, en particulier dans les situations où une réponse spécifique comme la réponse T est requise.

La cellule dendritique est la cellule présentatrice d'antigènes (APC) par excellence. Les DC peuvent provenir de la différenciation de la lignée lymphoïde (DC classique) ou de la lignée myéloïde (Monocyte-Derived Dendritic Cells) qui se révèlent aussi efficaces dans l'activation des lymphocytes CD4⁺ ou CD8⁺. Ceci suggère donc que les monocytes peuvent contribuer à l'élaboration d'une réponse T spécifique à différents niveaux [156]. Bien que dotés de propriétés moins performantes que les DC, les macrophages disposent du matériel nécessaire à la présentation des antigènes (Ag) [102,136].

Le CMH I est responsable de la présentation de peptides cytosoliques, endogènes ou non (par exemple les virus). La cellule reconnaît la protéine à dégrader et la dirige vers le protéasome par un réseau d'ubiquitine. La protéine est alors dégradée en peptides qui rejoignent le réticulum endoplasmique où ils vont être pris en charge par les molécules du CMH I. Ce complexe CMH I-peptide se localise ensuite dans l'appareil de Golgi qui l'achemine jusqu'à la surface cellulaire [157].

Le CMH II ne présente que des Ag exogènes acquis par phagocytose, il représente donc un acteur majeur dans la reconnaissance des agents pathogènes intracellulaires séquestrés dans les vacuoles. Le CMH II est assemblé et stocké dans une vacuole de l'appareil de Golgi nommée MIIC (MHC II Compartment). Cette vacuole contient une molécule accessoire (HLA-DM) qui sera responsable de la formation du complexe CMH II-peptide. Les phagolysosomes qui contiennent les peptides issus de la dégradation des micro-organismes et des antigènes protéiques par les enzymes lysosomales vont fusionner avec le MIIC. Les peptides vont se nicher dans la poche à peptide de la molécule CMH II avant de migrer vers la surface cellulaire [102].

Une fois les complexes CMH I- et CMH II-peptide exposés à la surface des APC, les APC migrent vers les noeuds lymphatiques où elles pourront activer les lymphocytes T.

I.2.3.2 Activation des lymphocytes T

Lors de leur arrivée dans le centre lymphoïde, les APC entrent en contact avec les lymphocytes T naïfs au niveau du cortex, grâce aux adhésines qui favorisent le rapprochement entre cellules. L'activation complète des lymphocytes requiert au moins deux signaux qui garantissent la spécificité de la réponse de l'hôte [8].

Le premier signal correspond à l'interaction non covalente du TCR (T Cell Receptor)-CD3 du lymphocyte T avec le complexe CMH-peptide de l'APC. La liaison se trouve renforcée par des corécepteurs, les glycoprotéines membranaires CD4 pour les lymphocytes T auxiliaires et CD8 pour les lymphocytes T cytotoxiques, qui interagissent avec le CMH et stabilisent le complexe CMH-TCR [158].

Le second signal provient de la liaison des molécules de co-stimulation comme CD28 ou CTLA4 à la surface des lymphocytes qui s'associe à la protéine membranaire B7 (B7-1/B7-2) exprimée par l'APC activée. L'association des deux signaux permet l'expansion clonale des lymphocytes T naïfs de façon autocrine, médiée par l'augmentation de la synthèse d'IL-2 et l'augmentation de l'expression et de l'affinité d'IL-2R, son récepteur [159] (Figure I-25).

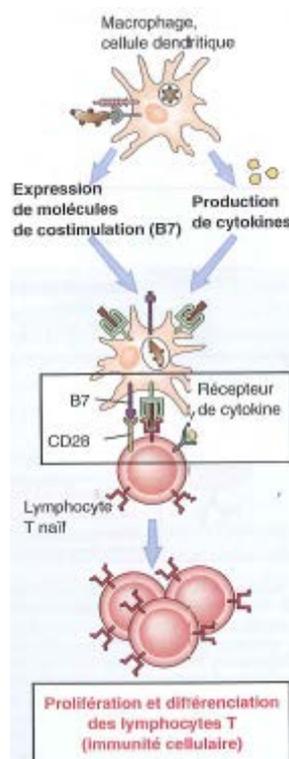


Figure I-25: Lien entre immunité innée et immunité adaptative [8].

Les macrophages répondent aux microbes phagocytés en exprimant des molécules de costimulation (par exemple B7 reconnue par le CD28 des L_T) et en sécrétant des cytokines (par exemple IL-12). Ces molécules agissent conjointement à la reconnaissance des antigènes pour activer les lymphocytes T.

Comme mentionné précédemment, les lymphocytes T CD8⁺ dits « cytotoxiques » expriment le corécepteur CD8 qui se lie au CMH I. Ces cellules provoquent la lyse des cellules infectées par des organismes cytosoliques après la reconnaissance du complexe CMH I-Ag. D'autre part, il existe les lymphocytes T CD4⁺ dits « auxiliaires » qui ne reconnaissent que le CMH II exprimé par les APC.

Les L_T CD4⁺ se divisent en diverses sous populations, qui se distinguent par leur profil de sécrétion de cytokines. La dichotomie stricte entre lymphocytes Th1 et Th2 qui prévalait il y a quelques années semble aujourd'hui dépassée dans la mesure où les cytokines produites évoluent en fonction du contexte. Brièvement, les cytokines Th1 sont considérées comme des activateurs des macrophages dont les capacités bactéricides et phagocytaires sont décuplées. IL-12, la cytokine clé du phénotype Th1 induit la production d'IL-2, d'IFN γ et de TNF α chez le lymphocyte. La production d'IFN γ stabilise en retour l'expression de son récepteur et renforçant encore la polarisation de la réponse.

Ces médiateurs activent le macrophage pour la production de l'IL-12, de métabolites oxygénés et azotés, et les molécules du CMH II [160]. Le profil Th1 est donc impliqué dans la lutte contre les infections associées aux organismes intracellulaires. Le profil Th2 est plus favorable à la réponse anticorps car il favorise l'activation des lymphocytes B et la sécrétion d'anticorps, en plus de l'activation des éosinophiles ; il permet également l'inhibition de la réponse Th1. Elle est caractérisée par la production d'IL-4, d'IL-5, d'IL-10 et d'IL-13.

Aux lymphocytes Th1 et Th2 se sont ajoutés les phénotypes Th17, Th9 et Treg. Sous l'influence de l'IL-6 et TGF- β , le L_T CD4⁺ se différencie en lymphocyte Th17 chez la souris, cette voie étant stabilisée et amplifiée par l'IL-21 et l'IL-23 [161]. Chez l'homme, il existe des désaccords parmi les auteurs à propos des cytokines impliquées dans cette voie de différenciation. Si certains considèrent que l'IL-1 β et l'IL-23 suffisent à activer la voie Th17 [162], d'autres ont montré que l'IL-6 et le TGF- β sont également indispensables à la différenciation des cellules Th17 [163]. Les cellules Th17 sont connues pour être des actrices majeures de l'inflammation locale notamment par la production d'IL-17A, d'IL-17F, d'IL-21 et d'IL-23, et grâce au recrutement des neutrophiles et des macrophages dans les tissus infectés [164,165]. La réponse Th17 a un rôle déterminant dans la mise en place d'une réponse immune protectrice lors d'infections bactériennes et fongiques, en particulier vis-à-vis d'*A. fumigatus* ou *C. albicans* [166]. Cette composante sera développée plus tard dans ce manuscrit (*I.4.1.2.3.1.4 Initiation de l'immunité adaptative*).

Par ailleurs, les lymphocytes Th17 sont impliqués dans les processus inflammatoires chroniques [167] ou allergiques, mais aussi dans certaines maladies auto-immunes (arthrite rhumatoïde, maladie de Crohn entre autres) qui étaient auparavant plutôt associées à la voie Th1 [168,169]. Bien que le phénotype Th9 ne soit pas à ce jour considéré comme un profil à part entière, les lymphocytes Th9 produisent de l'IL-9 et proviennent de la différenciation des Th2 sous l'influence du TGF- β . Ils sembleraient impliqués dans la protection contre les helminthes et certains processus pathogènes.

I.3 Les bêta-glucanes et structure de la paroi de levure

I.3.1 La paroi des levures, structure et fonction

Initialement, la paroi des levures était considérée comme une structure inerte, assurant la rigidité et la protection du protoplaste (cellule privée de sa paroi) vis-à-vis des contraintes environnementales qui incluent la température, le pH, les substances chimiques et la pression osmotique [170]. Désormais, elle est reconnue comme étant une structure biologiquement active qui est essentielle à la pathogénie de certaines levures comme *C. albicans*. En outre, elle est dotée de propriétés immuno-modulatrices. Elle constitue le point d'interaction avec le milieu extérieur et reste la cible privilégiée des défenses de l'hôte [171]. La paroi est une structure dynamique, assurant l'intégrité de la cellule notamment durant la morphogénèse, et complexe avec une architecture stratifiée formant un échafaudage pour la couche externe de glycoprotéines. Ces dernières et en particulier les chaînes latérales N-liées, limitent la perméabilité de la paroi aux macromolécules et assure donc la protection des poly-osides squelettiques contre les attaques des protéines étrangères (complément, anticorps, enzymes dégradantes) [170]. La paroi conditionne ainsi l'adhérence et donc la reconnaissance des cellules des réponses innée et adaptative de l'hôte [172,173]. La composition de ce réseau tridimensionnel dynamique est soumise à des changements et peut varier au sein d'un même isolat selon les conditions et le stade de la croissance. Tous les composants de la paroi sont extrêmement entremêlés pour former un réseau complexe qui constitue la structure basale de la paroi de levure. *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) consacre une grande quantité d'énergie métabolique dans la construction de sa paroi. Selon les conditions de croissance, sa paroi représente de 15 à 30% de la matière sèche de la masse totale et entre 25 et 50% de son volume [174,175]. La paroi de *Sc* est majoritairement composée de polymères de sucre (85%) entre-chassés de glycoprotéines (15%), et plus minoritairement de lipides.

Les trois composants majeurs, que l'on peut également retrouver chez les champignons étudiés jusqu'à ce jour, sont (i) les β -glucanes (BG), des polymères de glucose, (ii) la chitine, un polymère de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et (iii) les mannoprotéines, des protéines sur lesquelles sont greffés polymères de mannose [176]. Alors que ces trois molécules sont entremêlées au sein de la paroi, la chitine tend à prédominer à proximité de la membrane cellulaire et les mannoprotéines, très glycosylées ont tendance à émaner plutôt des couches périphériques (Figure I-26).

En microscopie électronique, la paroi révèle une ultrastructure en couches.

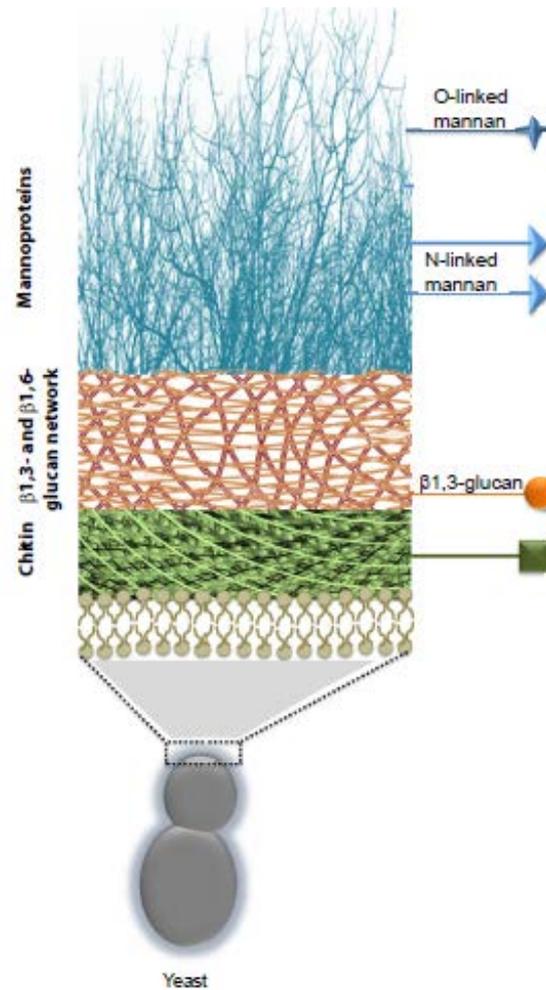


Figure I-26: L'organisation structurale de la paroi de levure. Adapté de [177].

Les β -glucanes (BG) sont les polysides les plus abondants de la paroi de *Sc*, ils représentent entre 50 et 65% de la matière sèche de la paroi [178]. Ce sont des polymères de D-glucose qui peuvent être divisés en deux sous-ensembles suivant le type de liaison des unités de glucose : (i) les longues chaînes d'environ 1500 unités de glucose chacune, liées en $\beta(1,3)$ qui sont majoritaires (85% des BG totaux) et (ii) les courtes chaînes d'environ 150 molécules chacune, liées en $\beta(1,6)$ qui représentent 15% des BG totaux de la paroi (Tableau I-7) [178].

Les mannoprotéines représentent près de 40% de la matière sèche de la paroi [175] sachant que le contenu actuel en protéines n'est que de 4 à 5%, le reste étant représenté par les résidus mannose liés à ces protéines via des liaisons en O ou en N (respectivement O-linked mannane ou N-linked mannane), ce qui explique le degré de branchement élevé de ces molécules [179].

Enfin, la chitine directement au contact de la membrane plasmique, ne contribue que pour 2% de la matière sèche de la paroi mais peut atteindre 20% de son contenu dans des conditions de stress ; cela concourt à augmenter la résistance mécanique de l'ensemble et de prévenir la lyse cellulaire [175].

Macromolécule	Wall dry wt. (%)	Site of synthesis	Mature form	
			DP	Branching
Mannoproteins	35-40	Secretory pathway	200 ^a	Highly branched
β 1,6-Glucan	5-10	(PM)	140	Highly branched
β 1,3-Glucan	50-55	PM	1500	Moderately branched
Chitin	1-2	PM	190 ^b	Linear

Tableau I-7: Les macromolécules de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae* [178].

Les composants sont présentés dans l'ordre d'apparition dans la paroi, de la périphérie vers la couche interne. La paroi de *C. albicans* suit approximativement la même composition. Le site de la synthèse des β (1,6) est incertain. Les données chiffrées peuvent varier suivant les conditions de croissance. DP, degré de polymérisation ; PM, membrane plasmique. ^aChaînes N ; ^bChitine provenant des cicatrices embryonnaires.

Des analyses biochimiques ont révélé que les polysides constituent un réseau complexe où les résidus de glucose entretiennent entre eux des liaisons covalentes de type β (1,3) et β (1,6) et de type β (1,4) avec la chitine (GlcNAc) [180]. D'autre part, les mannoprotéines peuvent être liées aux molécules de β (1,6)-glucose via un système élaboré de GPI (GlycosylPhosphatidylinositol), et aux β (1,3)-glucose par des liaisons de type ASB (alkali-sensitive bonds). A partir de ces études, une représentation de la structure de la paroi a été établie et est illustrée à la Figure I-27.

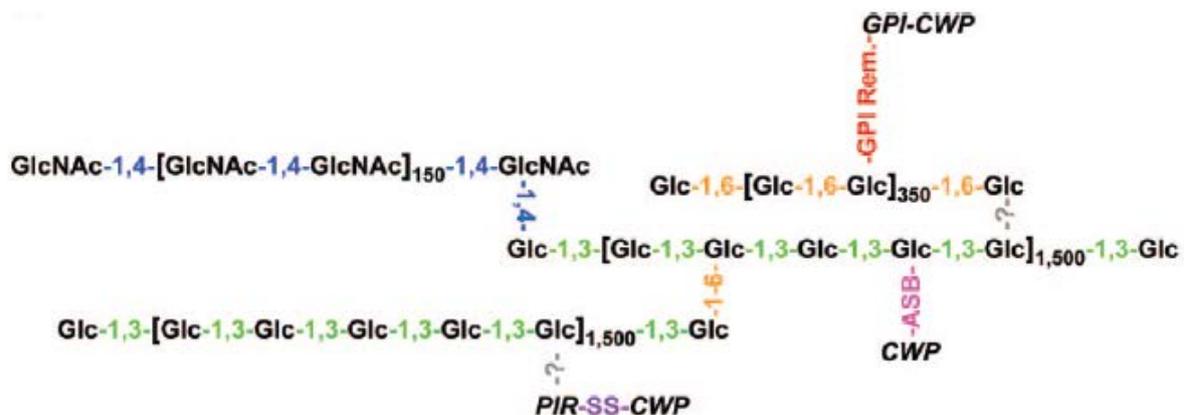


Figure I-27: Représentation schématique de l'architecture des constituants de la paroi de *Sc* [180].

Les liaisons β (1,3), β (1,4) et β (1,6) sont représentées en vert, bleu et orange respectivement. CWP, Cell Wall Mannoproteins ; ASB, Alkali-sensitive bonds ; PIR, PIR protein ; SS, disulfure bonds ; GPI Rem, GPI residue. La figure illustre qualitativement des liaisons de la paroi. (?) Ce type de liaison n'est pas caractérisé à ce jour.

I.3.2 Les bêta-glucanes, sources et structures associées

Comme nous l'avons vu précédemment, les glucanes sont des polymères de glucose liés par des ponts glycosidiques α ou β . Absents chez les animaux, ils sont les composants majeurs de la paroi des champignons ; ils sont aussi présents chez les bactéries et les plantes. La cellulose, le polysaccharide le plus abondant dans la nature, est un $\beta(1,4)$ -glucane [181]. Les membres de ce groupe de polysaccharides diffèrent sur de nombreux points incluant le type de liaison et de branchement, le poids moléculaire, la solubilité et la structure tridimensionnelle. Les glucanes présentant une structure basale en $\beta(1,3)$ prédominent dans les parois des champignons avec parfois des chaînes latérales liées en $\beta(1,6)$ [182]. Initialement, la chaîne principale est constituée d'une répétition d'unités β -D-glucose liées linéairement entre elles par des liaisons β , et notamment entre le carbone 1 d'une molécule de glucose et le carbone 3 de la suivante: $\beta(1,3)$ [183]. Ces β -D-glucanes forment de longues molécules cylindriques pouvant contenir jusqu'à 250 000 unités de glucose.

Alors que nous avons précédemment développé une vue d'ensemble de l'organisation de la paroi, il est important de préciser qu'il existe des différences considérables entre les espèces de levures ou de champignons, mais également entre les souches appartenant à une même espèce [176]. Par exemple, certaines souches de *Histoplasma capsulatum* contiennent des α -glucanes en plus des β -glucanes [184]. Des études récentes ont montré que des champignons filamenteux tels que *Neurospora crassa* et *Aspergillus fumigatus* sont dépourvus de $\beta(1,6)$ -glucanes mais possèdent des $\beta(1,3)(1,4)$ -glucanes (ayant une structure plutôt linéaire caractéristiques des espèces végétales, qui n'ont jamais été identifiés dans les espèces fongiques) [185]. Par ailleurs, il existe également des différences plus subtiles telles que la variation dans la longueur de la molécule basale et le type de liaisons impliquées dans les BG [173]. Certaines molécules de BG ne contiennent pas de chaînes latérales, notamment le BG bactérien initialement isolé d'*Alcaligenes faecalis* ou Curdlan qui n'est formé que de liaisons glucosidiques $\beta(1,3)$ [186] (Figure I-28A). Bien que leur taille reste très variable, tous les BG fongiques identifiés à ce jour contiennent soit des branchements $\beta(1,3)$ soit $\beta(1,6)$ [187]. Nombre d'entre eux, tels que le Schizophyllan (ou Sizofiran) issu de *Schizophyllum commune* et le Scléroglycan issu de *Sclerotium glaucinum*, possèdent une chaîne principale liée en $\beta(1,3)$ avec en moyenne une chaîne de substitution $\beta(1,6)$ tous les trois résidus glucose (Figure I-28B). Le poids moléculaire initial peut varier de 1,3 à 6×10^6 g/mole [188].

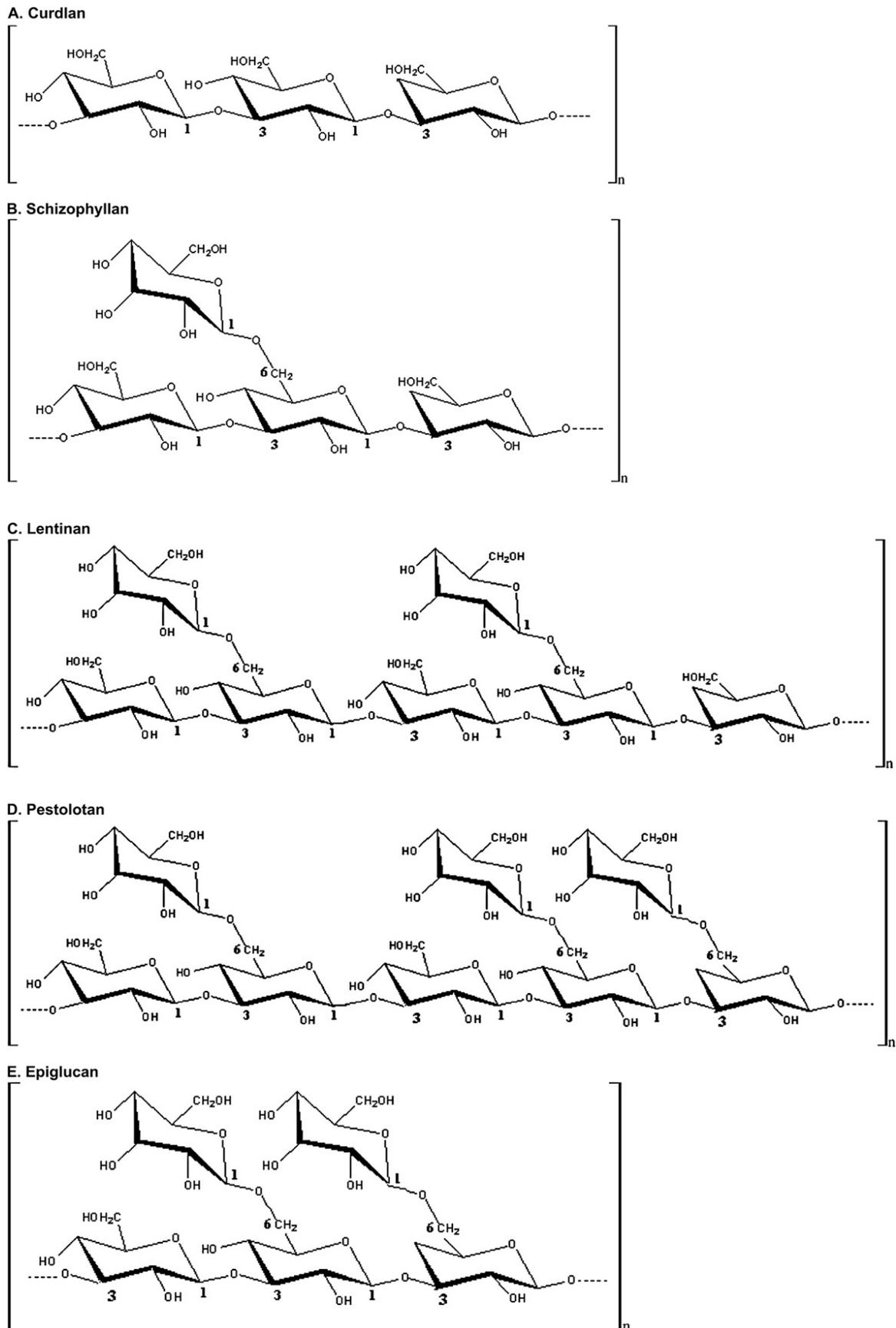


Figure I-28: La diversité des branchements au sein des $\beta(1,3)(1,6)$ -glucanes [6]

Alors que le Lentinan (ou SPG, *Lentinus edodes*) possède deux chaînes latérales $\beta(1,6)$ avec un espacement de cinq résidus glucose le long de la chaîne principale, l'Epiglucan (*Epicoccum nigrum*) en contient deux tous les trois résidus en moyenne (Figure I-28C et E) [187]. Le Pestalotan, produit de façon extracellulaire par *Pestalotia sp. 815*, semble être un composé hautement polymérisé avec en moyenne trois liaisons $\beta(1,6)$ tous les cinq résidus glucosidiques (Figure I-28D).

De nombreux autres BG fongiques ont été décrits dans la littérature mais leur structure moléculaire détaillée et la fréquence des branchements restent mal connues. Globalement, le degré de branchement et le poids moléculaire des BG varient entre 0,2-0,33 et 100-200 kDa respectivement, sachant qu'une structure en triple hélice contenant des liaisons $\beta(1,3)$ ou $\beta(1,6)$ semble être essentielle à la mise en place d'une réponse biologique efficace [189]. Les principales molécules avec un potentiel intérêt biologique sont listées dans le Tableau I-8.

Le Zymosan et le WGP (Whole Glucan Particle) isolés de *Sc* sont particulièrement bien décrits. Le Zymosan a été initialement décrit par Pillemer & Ecker en 1941, puis son étude a été complétée par Riggi & Di Luzio dans les années 60 [1,190]. C'est un extrait brut de paroi de levure constitué d'un mélange de différents composants dans des proportions qui reflètent celles de la paroi de *Sc* avec un titre en BG compris entre 50 et 60% de la matière sèche [191]. En revanche, le WGP est un composé purifié constitué de « fantômes » de paroi et riche en BG, sous forme de sphères de 2 à 4 μm de diamètre [192].

La structure macromoléculaire des BG issus des levures et des autres champignons est largement conditionnée par la source, mais elle dépend aussi du procédé d'extraction. En effet, suivant la méthode d'extraction utilisée, la structure des BG peut être modifiée et les BG obtenus peuvent être de nature soluble ou insoluble [193]. Par exemple, la présence de groupes $-\text{COOH}$ semble favoriser la solubilité des composés, de même qu'un degré de polymérisation supérieur à 100 [188]. Récemment, Byun et al ont étudié l'influence d'un traitement oxydatif sur la solubilité des BG [194]. La solubilité augmente lorsque que la dose d'irradiation absorbée augmente. Il existe de nombreuses formes de BG solubles, notamment le Grifolan (GRN), le Schizophyllan (SPG) ou le Scléroglycan (SSG) ; les structures de ces composés sont en général linéaires en triple hélice en condition aqueuse [183]. Les BG insolubles ont été isolés pour la première fois à partir de *Lentinus edodes* puis des levures (*C. albicans*) grâce à l'utilisation combinée du NaClO oxydatif puis du DMSO (diméthylsulfoxyde) [195].

Glucan	Abbreviation	Fungal Source	Structure
Curdlan		<i>Alcaligenes faecalis</i> (bacterial)	Linear β -(1→3)-glucan
Grifolan	GRN	<i>Grifola frondosa</i>	Two β -(1→6) branched glucose residues for every five β -(1→3) glucose residues
Lentinan		<i>Lentinula edodes</i>	One β -(1→6) branched glucose residue for every three β -(1→3) glucose residues
Schizophyllan(Sizofiran)	SPG	<i>Schizophyllum commune</i>	One β -(1→6) branched glucose residue for every three β -(1→3) glucose residues
(Sonifilan)	SPG		Ultrasonic partial degradation of schizophyllan
Scleroglucan	SSG	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	One β -(1→6) branched glucose residue for every three β -(1→3) glucose residues
Zyмосan		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Crude cell wall extract of genetically engineering yeast containing a mixture of β -(1→3)(1→6) glucans and mannose
	MG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Microparticulate form of the β -(1→3) glucan
Betafectin	PGG	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	β -(1→6) branched glucose residues of β -(1→3) glucan
Krestin	PSK	<i>Trametes versicolor</i>	Protein-bound β -(1→3) glucan
Yeast whole β -glucan particules	WPG	<i>Saccaromyces cerevisiae</i>	Crude preparation β -(1→6) branched glucose residues of β -(1→3) glucans
Pestolotan		<i>Pestalotia sp. 815</i>	Three β -(1→6) branched glucose residues every five β -(1→3) residues
Epiglucan		<i>Epicoccum nigrum</i>	Two β -(1→6) branched glucose residues every three β -(1→3) glucose residues

Tableau I-8: Exemple de β -glucanes et leur diversité moléculaire [6].

I.3.3 Les autres composants de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*

I.3.3.1 La chitine

La chitine est considérée comme un composant relativement mineur de la paroi, mais il est essentiel à la viabilité cellulaire du point de vue structural [196]. La chitine ne représente que 1 à 2% de la matière sèche totale de la paroi des levures alors qu'elle peut atteindre 10 à 20% chez les champignons filamenteux de type *Aspergillus* ou *Neurospora* [187]. Lorsqu'une mutation affecte la glucan-synthase responsable de la synthèse des BG, le protoplaste engage une voie de signalisation dite 'salvatrice' dans laquelle la synthèse de chitine est élevée pour restaurer la résistance de la matrice pariétale. Absente dans les espèces animales, la chitine est présente chez les levures, les nématodes parasites, les insectes et les coquilles des crustacés [197]. Non toxique et non nocive pour l'environnement, la chitine est largement utilisée pour des applications cosmétiques, médicales et en agriculture. Pour son utilisation commerciale, la chitine est extraite de la coquille des crustacés à partir des sous-produits de l'industrie marine [198].

La chitine est un long homopolymère de N-Acetylglucosamine lié en $\beta(1,4)$. Elle est reliée par des liaisons glucosidiques aux branchements des $\beta(1,3)$ - et des $\beta(1,6)$ -glucanes (Figure I-27) [199]. La forme la plus répandue en milieu aqueux et dans la paroi des autres champignons est l' α -chitine.

Sa structure est similaire à celle de la cellulose, la différence étant la présence d'un groupe aminoacétyl à la place d'un groupe hydroxyl sur le carbone 2 de la chitine [200] (Figure I-29).

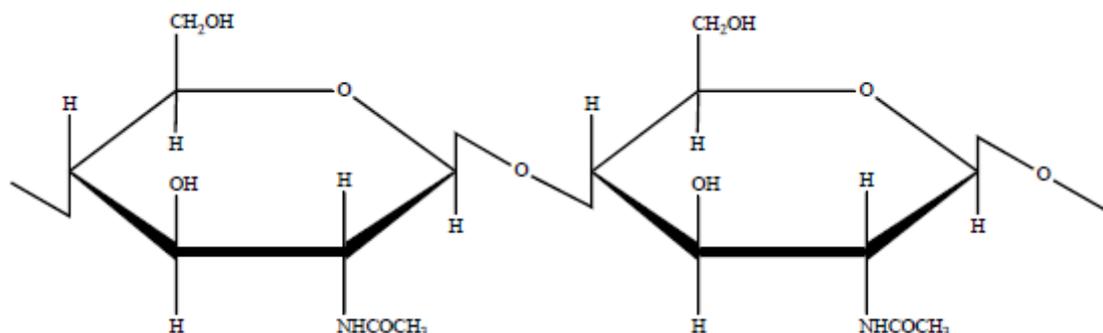


Figure I-29: Structure chimique de la chitine [181].

Les chaînes de chitine des différents modules s'assemblent pour former des micro-domaines d' α -chitine qui cristallisent dans l'espace extracellulaire directement adjacent à la membrane plasmique [197]. Ces polymères cristallins possèdent une force de tension élevée ce qui explique une contribution significative à l'intégrité globale de la paroi.

Le mécanisme précis de la synthèse de la chitine est fonction de l'espèce et implique plusieurs étapes de conversion enzymatique à partir des chitine-synthases. Les polymères de chitine qui en résultent sont insolubles dans la quasi-totalité des solvants organiques et sont extraits de leur source, principalement de la coquille de crustacés, par décalcification grâce à l'acide hypochlorique et par déprotéinisation à l'aide d'un traitement alcalin à haute température. Les microparticules de chitine sont ensuite purifiées et sélectionnées selon leur taille par sonication, broyage puis tamisage/filtration à la taille de 10 μm .

Certaines parois de champignons pathogènes, tels que *Cryptococcus neoformans* ou *Candida albicans* contiennent du Chitosan, un dérivé désacétylé soluble de la chitine [201]. Il s'agit d'un copolymère composé de 20% de résidus GlcNAc et 80% de résidus glucosamine (GlcN). Il est obtenu grâce à un traitement alcalin chaud [202]. Le terme Chitosan désigne en réalité une famille de chitine dé-N-acétylée de différents degrés, qui se caractérisent par leur poids moléculaire mais surtout par le degré de désacétylation (DD) [203].

Contrairement aux autres polysides présents dans la nature (cellulose, pectine, dextran...), le Chitosan est un composé hautement basique ce qui explique sa capacité à former des biofilms ou à chélater des ions métalliques. En fonction des conditions physico-chimiques environnantes et des DD, la solubilité du Chitosan peut être modifiée.

Par exemple, l'addition de sels en solution augmente la force ionique et abaisse la solubilité des chitosans. Inversement, leur présence dans la paroi fongique peut également accroître sa plasticité ce qui permet au protoplaste de s'adapter aux différents stimuli environnementaux [204]. Il a d'ailleurs été montré que les souches incapables de convertir la chitine en chitosan sont sensibles à des réactifs tels que les détergents ioniques (SDS) ou le NaCl qui modifient la pression osmotique et les échanges avec le milieu extracellulaire. Le Chitosan joue donc un rôle important dans le maintien de l'intégrité de la paroi des champignons quelles que soient les conditions du milieu environnant.

I.3.3.2 Les mannoprotéines

Les polymères de mannanes, qui ne peuvent exister sous cette forme, sont associés à des protéines de façon covalente pour constituer les mannoprotéines. Elles représentent environ 40% des polysides (matière sèche totale) et sont le principal composant de la matrice pariétale (Figure I-26 et Figure I-30). Leur insertion au sein de la paroi a été abordée précédemment dans la section *La paroi des levures, structure et fonction* (page 74). Le terme « mannane » désigne également le principal composant soluble doté de propriétés immunostimulantes présent dans la couche externe de la paroi de *C. albicans*. Il est également connu sous le nom de phosphomannoprotéine ou de complexe phosphopeptidomannane. Cette fraction de paroi est constituée d'homopolymères de D-mannose, de 4 à 5% de protéines et de 1 à 2% de phosphates [205]. Bien que des études génétiques et biochimiques aient révélé que la structure des mannoprotéines varie considérablement entre les espèces [206], les caractéristiques générales de ces polymères sont similaires entre *C. albicans* et *Sc.*

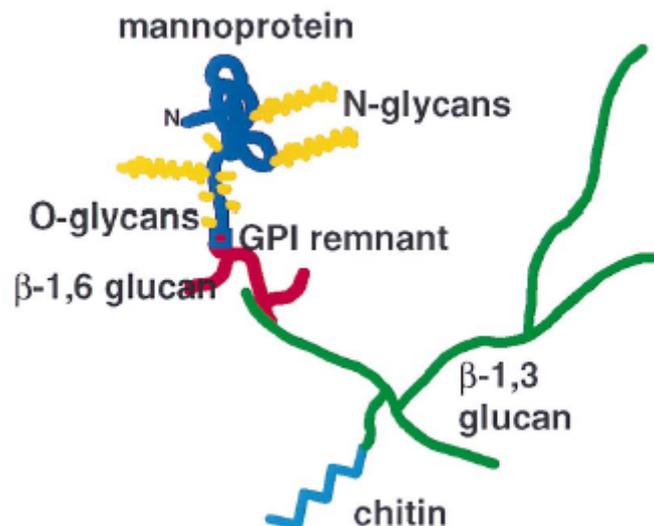


Figure I-30: Les relations des mannoprotéines avec les autres composants de la paroi de *S. cerevisiae* [174].

Les modules prototypiques et leurs composants sont colorés et nommés individuellement : les polypeptides des mannoprotéines (bleu), les oligosaccharides liés en O ou en N (jaune). La chitine peut également être branchée au β(1,6)-glucanes. Seules quelques branches de BG sont illustrées.

Les mannoprotéines de la paroi sont synthétisées dans le réticulum endoplasmique (RE) de la levure puis sont transportées vers la paroi par la voie sécrétoire (Tableau I-7) [207]. Une fois que les protéines ont atteint la lumière du RE, elles peuvent faire l'objet de modifications post-transcriptionnelles, notamment l'addition d'oligo-osides riches en résidus mannose (les mannanes).

Les polymères de mannoses sont liés à la fraction protéique et notamment aux résidus :

- (i) asparagine (Asn), grâce à des liaisons N-glycosidiques (ou amide) entre deux résidus GlcAc (di-N-acetylchitobiose), et
- (ii) thréonine/sérine (Thr/Ser), grâce à des liaisons O-glycosidiques (ou ester), sensibles aux conditions alcalines [177].

Les mannanes subissent ensuite un processus d'élongation dans l'appareil de Golgi, où ils acquièrent leur structure définitive.

Les « O-linked mannanes » sont formés de simples résidus mannose liés en $\alpha(1,2)$, en $\alpha(1,3)$ ou en $\beta(1,2)$ chez *C. albicans* (jusqu'à 5 unités). Les « N-linked mannanes » sont composés d'une chaîne principale de résidus $\alpha(1,6)$ -mannopyranosyl (jusqu'à 200 unités), à laquelle s'attachent des chaînes latérales de résidus mannose liés en $\alpha(1,2)$ qui ressemblent aux « O-linked mannanes » [208]. Ces branches peuvent être constituées de liaisons terminales en $\alpha(1,2)$ -, en $\alpha(1,3)$ - ou en $\beta(1,2)$ -résidus.

De façon commune aux N- ou aux O-linked mannanes, les oligo-osides s'attachent à ces branches grâce à des liaisons phosphodiester pour former les phosphomannanes. Ils peuvent être considérés comme un squelette moléculaire pour les N-linked mannanes suite à l'ajout de plusieurs $\beta(1,2)$ -mannoses (jusqu'à 14 unités).

Les chaînes des « O-linked mannanes » sont courtes et rigides, et en entrelaçant les $\beta(1,3)$ -glucanes, ils contribuent au renforcement de la paroi de l'organisme [180]. De plus, les mannoprotéines montrent en général un niveau élevé de glycosylation. Le rôle des protéines pariétales liées par des liaisons covalentes dans des processus comme la rétention d'eau, l'adhésion et la virulence n'est plus à démontrer. Nombre de ces fonctions requièrent une glycosylation appropriée. La survenue de mutations dans les voies de synthèse de la mannosylation ou de la glycosylation affecte collectivement toutes les mannoprotéines, altère la composition de la paroi et est à l'origine de phénotypes multiples tels que l'hypersensibilité au stress ou à certains agents [179,209].

La structure des mannoprotéines peut également varier suivant les espèces et les souches de champignons. C'est le cas d'*Aspergillus fumigatus* dont la paroi possède des galactomannanes [185,210]. Ces polymères sont composés d'une chaîne principale de résidus α -mannoses à laquelle sont reliées des courtes chaînes latérales de résidus $\beta(1,5)$ -galactofuranoses. Tout

comme les N- et O-linked mannanes, le galactomannane est associé au $\beta(1,3)$ -glucane pour former un réseau complexe qui stabilise la paroi des espèces fongiques.

I.3.3.3 Les glycolipides

Les glycolipides sont des composants mineurs de la paroi des levures et des hyphes. Ils représentent entre 1 et 7% de la matière sèche de la paroi [205]. Plusieurs études ont identifié la présence d'un glycolipide, le phospholipomannane (PLM) dans la paroi de *C.albicans* [211]. Ce glycolipide est formé d'un phytocéradime, un domaine polysaccharadique hydrophile constitué par une chaîne linéaire de 19 résidus $\beta(1,2)$ -mannoses. Ce phytocéramide fait la jonction entre la phytosphingosine et un acide gras hydroxylé C(24). Ce dernier joue le rôle d'échafaudage moléculaire pour la chaîne linéaire et contribue à l'expression de $\beta(1,2)$ -oligomannoside à la surface de la paroi du champignon, qui agit comme une adhésine pour les cellules de la lignée phagocytaire [211–213]. Cette action combinée à celle de la libération de PLM (phospholipomannane) par la levure pathogène lorsqu'elle entre en contact avec le macrophage, contribue à la virulence de *C. albicans* [213]. Ainsi, le $\beta(1,2)$ -oligomannoside, qui est spécifiquement exprimé à la surface de *C. albicans* et non celle de *Sc*, est un élément clé discriminatoire de la détection des levures pathogènes par les cellules de l'hôte [214].

I.3.4 Méthodes d'extraction des BG

Les différentes étapes de purification des $\beta(1,3)(1,6)$ -glucanes ont une importance majeure dans la mesure où elles peuvent affecter les propriétés physicochimiques et fonctionnelles des BG, *i.e.* la composition chimique, la solubilité, la viscosité, les propriétés d'hydratation et de liaison aux substrats lipidiques [188].

Le processus de fractionnement a pour but d'isoler les fractions d'intérêt, de quantifier les constituants et d'éliminer les composés indésirables. Par exemple, lors de la purification des $\beta(1,3)(1,6)$ -glucanes de *Sc*, les autres composés tels que les protéines, les lipides, les acides nucléiques contaminants, les minéraux et les mannanes sont éliminés en grande partie [215]. Les procédés d'extraction et de purification influencent considérablement la pureté des BG extraits, ainsi que le rendement obtenu. Le Tableau I-9 répertorie quelques résultats d'études réalisées sur le sujet [216–222].

Glucan (G)	Purity	Yield	Extraction processes	References
G1	92 ^a	10.4	Alkaline extraction	Xiaozhong et al. (2000)
G2	55	8.4	Alkaline-acid extraction	Saowanee et al. (2004)
G3	59	8.4	Homogenization-alkaline-acid	Saowanee et al. (2004)
G4	nd	3.7	Sodium hypochlorite-dimethyl sulfoxide	Ohno et al. (2001)
G5	nd	22.9 ^b	Autolysis-sodium hypochlorite oxidation	Yajun et al. (2003)
G6	85-83	26-25 ^b	Mild enzymatic isolation	Freimund et al. (2003); Jaehrig et al. (2008)
G7	93	11.2	Autolysis-homogenization-protease treatment	Liu et al. (2008)
G8 ^c	79	nd	Alkaline-acid extraction	

Tableau I-9: Effets des différents procédés d'extraction sur la pureté et le rendement en BG [188].

Toutes les données présentées sont exprimées en ratio de poids. nd, non déterminé.

^adétermination grâce à la méthode phénol/acide sulfurique.

^bcomparé à la matière sèche totale de la paroi.

^cfait référence au D-glucanes commerciaux de Zhuhai (Chine).

En raison de l'attrait pour les BG et notamment pour l'exploitation de leurs propriétés biologiques en industrie alimentaire, agronomique, cosmétique et thérapeutique, de nombreuses méthodes d'extraction ont été publiées dans l'intention d'obtenir un prébiotique facilement incorporable dans les produits finaux [223].

La méthode la plus couramment utilisée pour l'extraction des BG de la paroi de *Sc* repose sur l'application d'un traitement acide et alcalin [215]. En revanche, cette méthode comporte certains inconvénients dans la mesure où une grande quantité de BG est dégradée et peut alors être répartie à différents niveaux des gradients formés dans les surnageants au cours du processus de fabrication avec comme conséquence un rendement faible, en comparaison de la proportion initiale présente dans la paroi brute, et donc à une altération voire la perte des propriétés biologiques [224]. En outre, les réactifs utilisés sont toxiques et corrosifs [225].

Dans les espèces fongiques, l'extraction des BG est d'autant plus complexe à cause de la complexité structurale de la paroi et de la présence de pigments indésirables tels que la mélanine [223]. En général, les BG de ces sources sont extraits et fractionnés par rupture des liaisons hydrogène grâce à un traitement thermique suivi parfois d'un traitement en conditions alcalines, suivant le processus décrit chez le champignon *Basidiomycetes aphylophorales*.

Plus récemment, des recherches ont été menées sur de nouvelles méthodes d'extraction visant à optimiser le degré de purification des produits tout en réduisant les coûts de production. Les méthodes traditionnelles sont modifiées et sont combinées ou non à un traitement enzymatique. Par exemple, l'utilisation de la sonication après le traitement thermique ou une homogénéisation avant le traitement enzymatique contribuent largement à une amélioration de la qualité de l'extraction des BG par rapport aux méthodes classiques [217,219]. Cette alternative a notamment été investiguée chez *Sc* en combinant traitement à haute température, puis digestion enzymatique avec des enzymes comme la savinase et la lipolase [218]. Pour d'autres types fongiques, tels que *Pleurotus cornucopiae*, une hydrolyse enzymatique permet d'obtenir une fraction de BG solubles facilement récupérable [223]. La production de Grifolan, un BG soluble extrait de *Grifola frondosa* repose sur la fermentation et non la culture du dit champignon, une méthode originale qui permet de faciliter l'isolement de la fraction sans avoir recours à une étape d'extraction.

La notion de solubilité a déjà été mentionnée plus tôt dans ce manuscrit (cf. *Les bêta-glucanes, sources et structures associées*). Selon leurs propriétés de solubilisation, les BG peuvent être classés en trois catégories principales: (i) les $\beta(1,3)$ -glucanes insolubles en milieu alcalin et dans l'acide acétique, (ii) les $\beta(1,3)$ -glucanes solubles en milieu alcalin et (iii) les $\beta(1,6)$ -glucanes à haut niveau de branchement [189].

Ces étapes de purification, qui ne sont que rarement décrites dans le détail des articles publiés, ont une importance capitale pour la compréhension des phénomènes observés. En effet, la structure des BG et plus largement les propriétés physicochimiques de ces composés sont extrêmement corrélées aux activités biologiques potentielles de ces produits. Bien que le débat soit toujours engagé, de nombreuses études attestent que les BG insolubles (ou particuliers) sont dotés d'une meilleure activité immunostimulante que les BG dits solubles [2].

I.3.5 Activités biologiques des BG et intérêts pour la santé

Depuis des millénaires, de nombreux produits naturels provenant des Basidiomycètes sont utilisés par les médecines traditionnelles orientales, notamment en Chine et au Japon comme complément alimentaire avec une allégation santé. Ce n'est que récemment que les BG ont été identifiés comme étant les principes actifs contenus dans ces produits [1].

Par conséquent, de nombreuses études se sont intéressées à leur influence sur la santé humaine et animale, et ont identifié des effets immuno-modulateurs, anti-tumeurs, antioxydants et anti-radicaux libres, anti-cholestérol, anti-diabète, antiparasitaires, antifongiques, antibactériens, hépato-protecteurs, de détoxification ainsi que des effets positifs sur le système cardiovasculaire [6,183,188]. Les multiples effets favorables induits par les BG laissent penser qu'ils sont capables de stimuler une immunité non spécifique à large spectre chez l'hôte.

I.3.5.1 Importance des BG dans le traitement des cancers

La première fonction attribuée aux BG qui ait été décrite est la fonction inhibitrice sur l'apparition et la croissance des tumeurs [226,227]. Depuis cette découverte, de nombreuses expérimentations utilisant des modèles animaux ont révélé des effets bénéfiques des BG d'origine fongique sur un large panel de tumeurs grâce à l'activation des cellules de l'hôte (cellules NK par exemple) [228].

Ils peuvent aussi bien limiter l'apparition des cancers que la prolifération des cellules métastatiques [6]. Bien que préliminaires et controversées, les données obtenues chez l'homme laissent présager des bénéfices potentiels des BG dans le traitement des cancers. En effet, au Japon, les BG tels que le Lentinan, le Schizophyllan et le PSK font d'ores et déjà partie du traitement clinique post-opératoire de certains cancers gastriques et colorectaux pour leurs effets positifs sur le taux de survie [7]. Par ailleurs, le $\beta(1,6)$ -glucane issu du basidiocarpe *Agaricus blazei* testé in vitro sur des cellules humaines ou administré in vivo par voie orale chez la souris : (i) induit l'apoptose et enclenche le programme de mort cellulaire dans les cellules ovariennes cancéreuses HRA ; et (ii) réduit la dissémination et la croissance des tumeurs dans les poumons et la cavité péritonéale chez la souris [229]. Comme le suggèrent les études, l'efficacité thérapeutique des BG dépend en majorité de leur composition chimique, configuration et propriétés physiques (poids moléculaire, pureté et degré de branchement) [230,231]. Celles-ci ont mis en évidence que les BG avec des poids moléculaires élevés semblent être plus efficaces que les BG de faibles poids moléculaires.

Cette efficacité repose non seulement sur le type de polymères (chaîne principale) mais également sur la présence et la proportion d'autres produits dans la préparation. Un exemple clair de cette collaboration a été mis en évidence dans une revue de Borchers à propos des effets modulateurs anti-cancer des produits dérivés du champignon *Agaricus blazei* [232].

Ce champignon contiendrait d'autres composants formant un complexe de $\beta(1,6)$ -, $\alpha(1,6)$ - et $\alpha(1,4)$ -glucanes associé à un glucomannane, qui inhibent la tumorigénèse (apparition des tumeurs) [183,233]. De plus, l'administration orale directe de la forme complète et lyophilisée du fruit chez le rat a induit une meilleure activité anti-mutagénèse (anti-carcinogénèse) dans le foie par rapport à l'extrait seul (obtenu par extraction aqueuse) [234]. Des résultats similaires ont été observés après un traitement oral à base de *Lentinula edodes* (ou shiitake) [235]. Les auteurs en concluent que les différents polysaccharides présents coopèrent et ciblent différentes populations cellulaires et différents récepteurs. Ainsi une stimulation plus complexe induite par la totalité des composants du champignon inhibe plus efficacement le développement des cellules cancéreuses [232,233]. Bien que certains polysides sont capables d'induire une réponse directe cytotoxique sur les cellules tumorales, il semble que les BG induisent préférentiellement une réponse anti-tumeur indirecte, médiée par les cellules de l'hôte [236]. En effet, des études menées in vitro et in vivo ont montré que certains polysides peuvent directement inhiber la prolifération des cellules tumorales et/ou provoquer leur apoptose par la répression de NF κ B [230] ou des divisions cellulaires [237].

Par ailleurs, les animaux ayant reçu un traitement PSK montrent une augmentation significative du nombre de neutrophiles dans les lavages broncho-alvéolaires et une régression de la taille et du nombre de tumeurs pulmonaires, reflétant l'activité immuno-modulatrice des BG en contexte tumoral [238].

Les BG peuvent aussi être impliqués dans les phases plus tardives de la carcinogénèse ou du développement des tumeurs in vivo comme le prouvent l'augmentation des niveaux de production de TNF α , IFN γ , IL-12, IL-1 β , la prolifération des cellules NK, l'activation des macrophages [238]. De plus, ils peuvent accroître les capacités anti-oxydantes des cellules de l'hôte et activer des enzymes impliquées dans la détoxification des composés mutagènes, lorsqu'ils sont administrés in vitro ou in vivo par voie orale [239,240]. Par ailleurs, les BG auraient un rôle d'adjuvants notamment grâce à l'augmentation de l'efficacité de certaines chimio- ou immunothérapies lorsqu'ils sont utilisés en complément (20% de régression supplémentaire par rapport au groupe non traité [241]).

Finalement, il s'avère que les BG d'origine fongique tels que le Lentinan, Pachyman, Scléroglycan, Grifolan, Curdlan et dérivés d'*Agaricus blazei* présentent des niveaux d'efficacité particulièrement élevés dans différents modèles de cancers in vivo où les taux de réduction des tumeurs varient de 90 (Scléroglycan) à 99% (Lentinan) [183].

I.3.5.2 Rôle des BG dans le traitement de l'hypercholestérolémie, du diabète, de l'hypertension et la cicatrisation

I.3.5.2.1 Hypercholestérolémie

Les maladies cardio-vasculaires en relation avec des taux élevés de cholestérol sanguin (LDL) sont une des principales causes de décès chez l'homme dans les sociétés occidentales [242]. Les LDLs, à la différence des HDLs, ont largement été associés au risque accru de développer des maladies coronariennes et artérielles.

Les BG issus des levures semblent être impliqués dans la réduction de la concentration de cholestérol dans le sang, bien que le mécanisme d'action reste à déterminer [6]. D'autre part, jusqu'à aujourd'hui très peu d'études se sont intéressées à ce sujet et ne se focalisent que sur les BG fongiques. De celles menées à bien, il ressort que les BG sont un moyen sain, peu coûteux et efficace pour réduire les LDLs et augmenter les taux de HDLs sanguins afin de réguler les dyslipidémies et ainsi prévenir l'hypertension et l'athérosclérose à l'origine des maladies cardio-vasculaires [243–245]. Dans une étude récente, les effets anti-inflammatoires de BG ont été observés sur les cellules des plaques d'athérome et notamment dans les macrophages dans lesquels ils inhibent l'activation de MAPK p38 induite par les LDLs oxydés [246].

I.3.5.2.2 Hyperglycémie/Diabètes

Plusieurs préparations de BG ont montré une réduction significative de la concentration du glucose sanguin en période postprandiale, notamment parce qu'ils ralentissent l'absorption du glucose et donc régulent le métabolisme du glucose [247]. En effet, chez le rat « diabétique », l'ingestion des polysides issus de *Tremella mesenterica* et de *Tremella aurantia* ont conduit à la réduction de la glycémie, de même que celle de *Phellinus baummi* chez le rat diabétique dans le modèle de diabète provoqué par la Streptozotocine [248,249]. Il a été montré ultérieurement que le composé actif n'est pas un BG mais un autre polyside complexe. Cela met en évidence le risque à interpréter les résultats d'expériences réalisées à partir de préparations fongiques non purifiées. Par ailleurs, les mêmes résultats (baisse de la glycémie) ont été obtenus suite à la supplémentation orale de 20% de poudre de maitake (*Grifola frondosa*) chez des souris diabétiques notamment grâce à l'augmentation de la sensibilité à l'insuline [250].

En revanche, un BG préparé par extraction aqueuse à chaud à partir du basidiocarpe *Agaricus blazei* a montré une activité anti-hyperglycémie, anti-hypertriglycéridémie et anti-hypercholestérolémie chez le rat diabétique [251]. Une fois encore, la contribution effective du BG ou des oligosaccharides dérivés est mise en question dans cette étude.

Cependant, une étude de 2014 a révélé qu'un traitement à base de BG purifié issu de *Sc* (disponible chez Sigma) retarde significativement l'hyperglycémie chez les souris NOD pré-diabétiques, notamment par leur activité immuno-régulatrice amplifiée en collaboration avec des antigènes de cellules pancréatiques β [252]. La structure de cette préparation de BG ainsi que son mécanisme d'action ne sont cependant pas connus. Il est donc nécessaire de préciser les caractéristiques structurales pour comprendre les mécanismes associés aux activités observées [6].

I.3.5.2.3 Hypertension artérielle

Bien que la capacité des BG à réduire l'hypertension soit encore une notion floue, certaines études ont associé l'administration de préparations de BG au contrôle de la pression artérielle.

En effet, la perfusion intraveineuse d'un extrait aqueux de mycélium de *Pleurotus sajor-caju* provoque une diminution de la pression sanguine moyenne chez le rat de façon corrélée à la dose administrée, le composé actif n'ayant pas encore été identifié [253].

Chez le rat génétiquement déficient sujet à l'hypertension spontanée (SHR), une diète contenant 5% de maitake a montré les mêmes effets [6]. Les données issues de la caractérisation structurale laisse penser que les effets observés ne sont pas forcément associés à la présence de BG. Par exemple, le composé du champignon Tamogi-take (*Pleurotus cornucopiae*) responsable de la réduction de la pression sanguine chez le rat SHR s'est révélé être le D-mannitol [254]. En revanche, la consommation de la totalité du basidiocarpe maitake et de son extrait soluble conduit à une baisse de la pression sanguine dans un modèle de rat diabétique (ZFR, Zucker fatty rats) [255].

Ainsi la possible implication des BG dans le contrôle et la réduction de l'hypertension artérielle reste floue, tout comme certains effets biologiques discutés ici. Il semble donc indispensable de concentrer les efforts sur l'utilisation de BG purifiés et structuralement caractérisés avec davantage de précision.

I.3.5.2.4 Le processus de cicatrisation

Des études réalisées dans des modèles animaux et chez l'homme ont montré que les macrophages activés par les BG issus de *Sc* sont capables de favoriser le processus de cicatrisation et de limiter la présence de tissus cicatriciels après un traumatisme ou une chirurgie [250].

Comparés à d'autres polysides (inuline, carraghénane, dextrane, amidon), les BG accélèrent la cicatrisation lorsqu'ils sont utilisés dans des conditions expérimentales. D'autre part, chez l'homme, l'application locale de $\beta(1,3)$ -glucanes associée à un antibiotique semble améliorer la cicatrisation grâce à une meilleure épithélialisation [244]. De même, en cas de brûlures graves et de dommages localisés, l'utilisation de BG augmente le nombre de macrophages et favorise la formation de granulomes [256]. Plus spécifiquement, les BG entraînent la production de collagène et de NF-1 (Nuclear Factor-1) par les fibroblastes humains. L'inhibition de ce dernier bloque l'induction de protocollagène à l'origine de nombreux facteurs de croissance impliqués dans la cicatrisation.

I.3.5.2.5 Action anti-oxydante des BG

Les antioxydants sont des substances naturelles capables de protéger l'hôte contre l'action des radicaux libres et de réduire les risques de développer diverses affections. Bien que l'acide ascorbique (vitamine C) ou l' α -tocophérol (vitamine E) soient les composés antioxydants par excellence, les chercheurs s'intéressent depuis peu au potentiel antioxydant des polysides [188]. Parmi eux, les $\beta(1,3)$ -glucanes issus de *Sc* semblent être impliqués dans la séquestration des radicaux libres [218]. Par ailleurs, les BG provenant des espèces d'*Aspergillus* ont été associés à une activité anti-oxydante (par capture des radicaux libres) plus marquée que l'acide ascorbique à la même concentration [188]. Une étude a également montré que les BG, grâce à leurs actions antioxydante et hydratante, entrent dans la composition de certains traitements ou produits (crèmes, gels, écrans solaires) qui préviennent les effets cutanés causés par le rayonnement solaire [257].

I.3.5.2.6 Les applications prébiotiques des BG

Le tractus digestif se caractérise par l'existence de diverses populations de micro-organismes, désignées par le terme de microbiote, qui s'adapte au régime alimentaire de l'hôte et reflète

son état de santé. Le concept de prébiotiques permet d'augmenter la digestibilité de certains aliments grâce à l'introduction d'une ou plusieurs nouvelle(s) population(s) capable(s) de dégrader certaines molécules et d'améliorer son état de santé. Les plus connus des effets des prébiotiques sont l'augmentation de la digestibilité du lactose, la réduction du cholestérol, l'augmentation de la résistance à certains agents pathogènes et la stimulation du système immunitaire [223]. Plusieurs études se sont concentrées sur les possibles applications prébiotiques des BG et ont révélé une augmentation de la croissance de certaines populations de bactéries lactiques du genre *Lactobacillus* et *Bifidobacterium* dans le tractus intestinal, pouvant avoir des effets bénéfiques sur la santé humaine [188]. L'utilisation des BG en tant que prébiotiques peut favoriser la colonisation du tractus digestif par une flore bactérienne bénéfique. Récemment, la déficience en Dectin-1 a été associée à la présence significative de *Lactobacillus murinus* dans le microbiote [258].

I.3.5.3 Importance des BG dans le traitement des maladies infectieuses

Un des problèmes majeurs du contrôle des maladies infectieuses, sous-estimé jusqu'il y a quelques années, est le développement d'antibio-résistance. Des BG d'origine fongique sont efficaces sur certains agents pathogènes, notamment grâce à la mise en place de mécanismes immuno-modulateurs. Dans cette section, je présenterais une vision globale de l'utilisation des BG dans la lutte contre les agents bactériens, viraux et fongiques. Les mécanismes précis de l'interaction des BG avec les cellules de l'immunité innée seront détaillés dans la partie suivante.

I.3.5.3.1 L'activité antivirale des BG fongiques

Bien que les données de la littérature ne soient qu'en majorité descriptive, le Curdlan bactérien, le Zymosan, le SPG, et le Lentinan semblent efficaces dans la prévention des infections associées à plusieurs agents viraux [250]. Alors que le SPG contrôle les infections chroniques par le virus de l'hépatite B en modulant les réponses immunitaires cellulaires et humorales [259], un *Sc* BG augmente le taux de survie des cellules provenant des souris infectées expérimentalement par ce virus en stimulant l'activité phagocytaire et en inhibant la nécrose [260].

Le Zymosan, un extrait brut de *Sc*, amplifie la réponse vaccinale au virus VIH (human immunodeficiency virus) chez la souris inoculée par voie intramusculaire, notamment via la stimulation d'une immunité Th1 (induction de l'IFN γ et d'immunoglobuline G2a) par les macrophages et les APC recrutées sous l'action du complément [261]. Le Zymosan administré par voie orale chez le porc est également impliqué dans la baisse de la charge virale évaluée par la quantification des acides nucléiques viraux dans les poumons suite à l'inoculation intranasale par le virus influenza (SIV, Swine Influenza Virus). Les concentrations d'IFN γ et d'oxyde nitrique mesurées dans les lavages broncho-alvéolaires des animaux ayant reçu le traitement oral aux BG étaient significativement plus élevées [262]. Des essais cliniques préliminaires réalisés chez des patients infectés par le HIV ont montré que seul ou en combinaison avec des agents antiviraux, le Lentinan (administré par i.v.) est associé à une augmentation du nombre de cellules CD4, la réponse développée contre le virus étant plus marquée lors de la double administration [6].

I.3.5.3.2 L'activité antifongique des BG fongiques

Lors d'immunodépression dans le cas d'une infection par le VIH ou d'un cancer, la survenue d'infections fongiques par des agents opportunistes ou une sollicitation excessive du système immunitaire peut devenir critique pour la survie du patient. Comme précisé plus tôt, les BG sont les composants majeurs des parois des champignons pathogènes et sont probablement des activateurs importants du système immunitaire [173,263].

Certains BG sont capables d'activer les cellules phagocytaires (macrophages, neutrophiles, cellules dendritiques) et ainsi améliorer la réponse immunitaire innée contre les infections fongiques [264]. C'est notamment le cas des BG isolés de *Pneumocystis carinii* qui activent les cellules épithéliales alvéolaires pour promouvoir la réponse innée et la sécrétion de cytokines [265]. Par ailleurs, le Zymosan a également une action sur la protection de l'hôte contre les infections provoquées par les champignons pathogènes tels que *Candida albicans* et *Pneumocystis carinii* [266–269]. Les macrophages péritonéaux isolés à partir de souris ayant reçu par i.p. des BG particulières de *Sc* ont une activité microbicide dirigée contre *Paracoccidioides brasiliensis* plus élevée que les cellules provenant d'animaux non traités [270]. Les cellules spléniques de ces souris produisent également significativement plus de TNF α et d'IL-12. Par ailleurs, la dissémination de *P. brasiliensis* est inhibée dans la rate et dans le foie par un traitement d'IL-12 exogène [271].

L'efficacité des traitements de chimiothérapie contre les infections provoquées par des agents opportunistes est souvent faible. Pourtant certaines études ont montré qu'en combinant une thérapie à base d'agents antifongiques et le G-CSF (Granulocyte Colony-Stimulating Factor) comme stimulant de la réponse, il est possible de traiter efficacement des souris immuno-déficientes infectées par *Aspergillus fumigatus* [272]. A ce jour bien qu'aucun traitement similaire ne soit mis en place, il semble important de mentionner que les BG d'origine fongique peuvent agir en coopération avec d'autres agents antifongiques et/ou stimulants immunitaires dans le but de lutter contre les infections opportunistes [273].

I.3.5.3.3 L'activité antibactérienne des BG fongiques

Certains BG incluant le Lentinan, le WGP (Whole Glucan Particle), sa forme soluble le PPG (Bétafectine) et le SSG (*Sclerotinia sclerotiorum* Glucan) ont été identifiés comme des modulateurs de la réponse antibactérienne.

Chez la souris, les effets protecteurs du Lentinan contre *Mycobacterium tuberculosis* ont été mis en évidence dans un modèle infectieux, et se sont manifestés par l'augmentation du nombre de macrophages péritonéaux [274]. *In vitro*, les macrophages ainsi générés ont montré une activité bactéricide plus marquée envers les cellules infectées par l'agent pathogène [275]. Dans cette étude, l'administration de Lentinan par i.p., a contribué à réduire les dommages tissulaires causés par cet agent bactérien.

Le WGP particulaire, tout comme le PPG soluble, des $\beta(1,3)(1,6)$ -glucanes purifiés à partir de *Sc*, ont contribué efficacement à l'élimination des infections liées à *Bacillus anthracis* notamment grâce à la production de cytokines pro-inflammatoires [276]. L'efficacité du PGG a été mise en évidence contre une souche de *Staphylococcus aureus* résistante à différents antibiotiques de la famille des β -lactamines (incluant la méticilline) en améliorant le taux de survie des patients de 80% [277].

Le PGG a également contribué au traitement des cobayes infectés par des souches de *S. aureus* et de *S.epidermis* résistantes à la méticilline [278]. Un dernier exemple ciblant le PGG et sa diversité d'action peut être cité : le PGG a réussi à prévenir la formation d'abcès suite à des infections localisées ; cet effet est encore accru lorsqu'il est utilisé en combinaison avec un antibiotique comme la céfazoline [279]. Si tous les résultats s'accordent à dire que le PGG présente un intérêt dans l'induction de réponse bactéricide à l'encontre un grand nombre

d'agents pathogènes, ce n'est pas le cas du zymosan et du SPG. En effet, les investigations portées sur l'évaluation des dommages tissulaires à la suite d'un challenge au LPS aboutissent à des résultats contradictoires. Certains ont montré que le SPG réduisait considérablement la toxicité associée à une stimulation au LPS par l'induction de *Tnfa* dans les cellules du foie chez le rat [280]. Cette hypothèse a néanmoins été contestée par certains auteurs ayant observé l'aggravation des lésions hépatiques initialement provoquées par le LPS, par le zymosan suite à la sécrétion de cette cytokine dans les cellules de Kupffer (macrophages hépatiques), ce qui accroît leur sensibilité au LPS [6].

Finalement, l'utilisation des BG pourrait être plus intéressante à titre préventif qu'à titre curatif, puisque le système immunitaire pourrait être conditionné et ainsi mieux à même de développer une réponse plus efficace à une infection subséquente. Une fois encore, il s'agit d'observations réalisées à partir de préparations de BG et non de BG purifiés, rendant difficile l'identification des ligands réellement responsables des effets favorables.

Ceci explique probablement les résultats contradictoires obtenus d'une préparation de BG à l'autre en condition infectieuse. Aucune étude n'a été consacrée à l'étude d'un récepteur en particulier et de son rôle effectif dans la mise en place d'une réponse antibactérienne à partir de la reconnaissance des BG d'origine fongique.

I.4 Interaction spécifique des BG et autres composants de la paroi de levure avec le macrophage

Considérant l'universalité de leur présence dans différents organismes dont certains sont potentiellement pathogènes et qui peuvent entrer en contact avec les organismes supérieurs, il n'est pas surprenant que certains composants de la paroi des champignons ou levure soient reconnus par le système immunitaire inné. Les conséquences de cette interaction dépendent du type cellulaire impliqué et de la nature des récepteurs engagés. Comme nous l'avons précédemment décrit, les cellules immunitaires des mammifères disposent d'un arsenal de PRRs qui détectent spécifiquement des structures portées par des organismes étrangers à l'organisme. Les composants des parois et notamment les BG se comportent comme des PAMPs, peuvent être reconnus par les divers PRRs et ainsi induire une activation de certaines cellules immunitaires. Alors que les expérimentations menées *in vitro* permettent le contrôle et la connaissance du type cellulaire testé voire même du récepteur ciblé, les conditions *in*

vivo impliquent l'activation possible de plusieurs types cellulaires et de récepteurs qui peuvent coopérer ou agir de façon opposée.

D'autre part, la section précédente nous a permis d'identifier de nombreux et divers effets biologiques induits par l'administration *in vivo* de préparations de BG. Parfois contradictoires selon les études, les données extraites reflètent la nécessité de caractériser plus finement ces préparations de BG, terme qui fait référence à une classe de polymères très hétérogènes, longs ou courts, branchés ou non, particuliers ou solubles, purifiés ou non, pouvant être extraits selon différentes méthodes à partir de différentes sources. Ainsi cela conduit à des extrapolations souvent inappropriées quant aux réactions immunitaires induites par les BG eux-mêmes, et par conséquent à attribuer injustement certaines propriétés aux BG qui sont le fait d'autres composants de la paroi des champignons. Il convient donc d'accorder une attention particulière aux composés effectivement présents dans les préparations et aux récepteurs ciblés.

I.4.1 Les récepteurs et voies de signalisation impliqués dans la reconnaissance des BG

Chez les mammifères, la reconnaissance des BG est un processus qui s'opère via des récepteurs cellulaires surfaciques. Initialement identifiés à la membrane plasmique des monocytes humains dans les années 1980 [281], ils ont ensuite été décrits chez d'autres cellules immunitaires telles que les neutrophiles, les macrophages, les cellules NK, les éosinophiles, mais aussi les cellules épithéliales alvéolaires, les cellules endothéliales et les fibroblastes [282].

La reconnaissance des BG et notamment les $\beta(1,3)$ -glucanes met en jeu plusieurs récepteurs dont Dectin-1, CR3 (CD11b/CD18 ou Mac-1), trois membres de la famille des récepteurs scavenger (CD5, CD36 et SCARF-1) et le glycosphingolipide membranaire Lactosylcéramide [176]. Les principaux rôles et conséquences de leur interaction avec les BG sont résumés dans le Tableau I-10 et la Figure I-31. Parmi ces molécules, Dectin-1 a été identifié comme le récepteur majeur des $\beta(1,3)$ -glucanes sur les leucocytes [283,284] car l'utilisation de souris déficientes pour le récepteur ou celle d'anticorps neutralisants spécifiques aboutit à l'abolition totale de la réponse des macrophages [267,285].

Receptor type	Chemical nature	Affected cells	Effects on immune response	Other ligands
Dectin-1	Glycoprotein	Monocytes Macrophages Neutrophils DC cells T-cells	Phagocytosis Endocytosis ROS production Cytokines (TNF- α , IL-2, 10, 12) MIP-2,	Intact fungi, T-cells
CR3	A heterodimer Consist of CD11b and CD18 chains	Myeloid NK Neutrophils Lymphocytes	Tumour cytotoxicity	A variety of pathogens
Scavenger	A heterogeneous group of molecules	Myeloid Endothelial	Immunity	LDL HDL Polyanionic Microbes
LacCer	Glycosphingolipid containing a hydrophobic ceramide lipid and a hydrophilic sugar	Neutrophils Epithelial	ROS Anti-microbial Cytokines (NF- κ B) Lyn kinase	A variety of microbes
TLR	A novel protein family with associated protein MyD88	Macrophages DC Lymphocytes Epithelial	Cytokines (NF- κ B, TNF- α , IL12)	A wide spectrum of microorganisms

CR3, complement receptor 3; CRD, carbohydrate-recognition domain; DC, dendritic cell; eNOS, endothelial nitric oxide synthase; LacCer, lacto-sylceramide; IL, interleukine; MIP, macrophage inflammatory protein-2; NK, natural killer cell; NF- κ B, nuclear factor-kappaB; ROS, reactive oxygen species; TNF- α , tumour necrosis factor-alpha.

Tableau I-10: Nature, rôle et effets des récepteurs de BG [6].

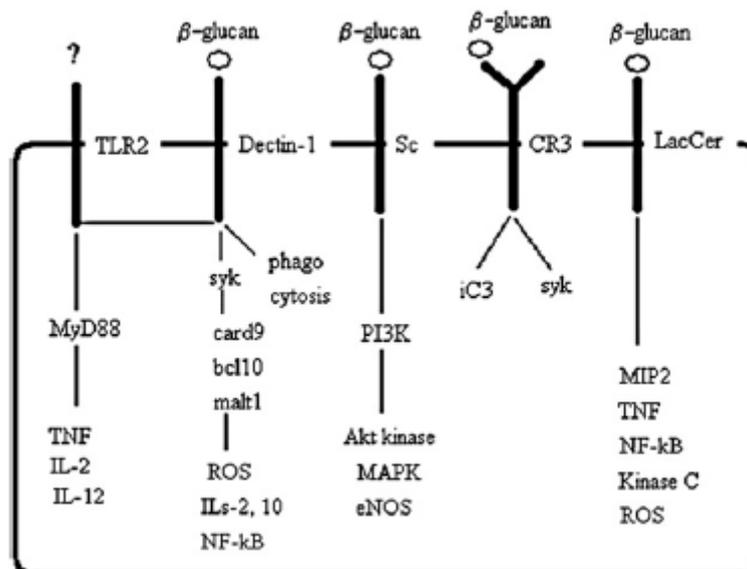


Figure I-31: Les voies de signalisation possiblement médiées par les récepteurs des BG fongiques [6].

I.4.1.1 CR3, Lactosylcéramide et récepteurs Scavenger

I.4.1.1.1 Le récepteur du complément récepteur CR3

Le récepteur CR3 (Mac-1 ou $\alpha_m\beta_2$) est une intégrine qui rassemble les sous-unités CD11b et CD18 par une liaison non covalente. Alors que le CD11b n'est présent que pour CR3, CD18 est omniprésent chez toutes les intégrines β_2 .

L'importance des intégrines est considérable pour l'organisme car la perte de CD18 entraîne la déficience de l'adhésion des leucocytes causant des infections récurrentes, qui à terme sont souvent létales [282].

CR3 dont l'expression augmente au moment de l'activation cellulaire, est exprimé principalement à la surface des neutrophiles, des monocytes circulants et des cellules NK mais aussi des macrophages, des DC, des éosinophiles et certains lymphocytes B et T [286]. CR3 fonctionne comme une adhésine et dispose de deux sites de liaison sur CD11b : (i) un site non opsonique localisé à l'extrémité C-terminale qui reconnaît divers ligands exogènes et (ii) un site opsonique localisé à l'extrémité N-terminale pour iC3b (Cleaved component 3 fragment of serum complement system), ICAM-1 et le fibrinogène. CR3 possède un domaine lectin-like distinct situé à l'extérieur du I-domaine de CD11b, qui est capable de se lier sélectivement et avec une forte affinité aux glucides (5×10^{-8} M) et notamment aux $\beta(1,3)$ -glucanes [287,288].

L'engagement de CR3 par les BG entraîne une adhésion accrue à l'agent microbien grâce à la modification de l'affinité du récepteur pour son ligand, active la voie de signalisation iC3b et induit cytotoxicité, phagocytose et migration (Figure I-31) [289,290]. Il semblerait que la cytotoxicité et la phagocytose requièrent un second stimulus puisque ces effets sont abolis par l'utilisation d'anticorps anti-CR3. En effet, la cytotoxicité médiée par CR3 a montré l'implication des kinases Syk et Phosphatidylinositol-3(PI3K) (Figure I-31) [291]. Par ailleurs, la translocation du récepteur et la signalisation via la kinase Lyn sont nécessaires à la phagocytose induite par CR3 [292].

CR3 identifié dans les années 80 [293], a longtemps été considéré comme le récepteur majeur des $\beta(1,3)$ -glucanes dont la reconnaissance est associée à des effets anti-tumoraux [289,294], des effets liés à la chimiotaxie des neutrophiles, aux fonctions d'adhérence et de migration transendothéliale [295,296]. De façon surprenante, certaines études suggèrent que CR3 ne reconnaît que les BG de faibles poids moléculaires (préférentiellement 25 kDa), générés par l'action des cellules phagocytaires sur les BG de poids moléculaires élevés [241,291].

L'identification d'autres récepteurs de BG en particulier Dectin-1 (cf. section correspondante) ainsi que la capacité non altérée des leucocytes CR3^{-/-} à reconnaître et à répondre aux BG, remettent en cause le postulat précédent et semblent indiquer que CR3 ne joue qu'un rôle mineur dans la reconnaissance des BG [283,297,298].

Cette dernière hypothèse est particulièrement vraie pour les neutrophiles et les macrophages qui expriment les deux récepteurs, Dectin-1 et CR3. Pour autant, ceci n'exclut pas la possibilité que ces 2 récepteurs soient tous les deux requis pour l'activation cellulaire induite par les BG. En revanche, dans le cas des cellules NK, et de toutes les cellules qui n'expriment pas Dectin-1, CR3 reste le récepteur majeur des BG [6].

I.4.1.1.2 Le Lactosylcéramide (LacCer)

Le Lactosylcéramide (LacCer, CDw17 ou Gal β 4Glc β 1Cer) exprimé dans des micro-domaines à la surface des neutrophiles et des cellules endothéliales est un glycolipide qui contient un lipide hydrophobe, le céramide et un fragment glucidique hydrophile. LacCer est connu pour se lier et adhérer à divers micro-organismes, notamment *C. albicans*, et peut ainsi jouer un rôle important dans l'immunité innée, en particulier pour les cellules non immunitaires [299].

La capacité du LacCer à reconnaître les β (1,3)-glucanes a été démontrée pour la première fois grâce des composants isolés des membranes plasmiques des leucocytes humains et un BG soluble issu de *Sc*, le PGG [300]. Cette étude a également révélé que seul l'usage d'anticorps anti-LacCer ou d'un BG de poids moléculaire élevé pouvait inhiber l'interaction avec le BG ainsi que les voies de signalisation subséquentement induites. Bien que le mécanisme d'action de LacCer dans l'immuno-modulation reste encore mal défini, l'interaction avec les BG induit la production de cytokines telles que MIP-2 et TNF α dans les cellules épithéliales alvéolaires de rat (BG issu de *Pneumocystis pneumonia*) [265,301], l'activation de NF κ B via PKC, l'augmentation de l'explosion respiratoire et de l'activité bactéricide dans les neutrophiles humains (PGG) [302] (Tableau I-10 et Figure I-31). Par ailleurs, Iwabushi et Nagaoka ont montré que LacCer est associé à une kinase Src, Lyn activée lors de la liaison du récepteur avec un ligand et conduisant à la génération de superoxydes via p38-MAPK, PKC et PI3K [303].

Bien que l'hypothèse d'une éventuelle collaboration entre CR3 et LacCer soit très controversée, une étude a montré que l'interaction de la kinase Lyn associée au LacCer avec CR3 est requise pour initier la voie de signalisation suite à la reconnaissance des BG par CR3 [292]. Cela suggère donc que CR3 et LacCer sont deux éléments constitutifs du même processus.

Cependant, (i) comme mentionné précédemment, les BG doivent être internalisés et être « digérés » en fragments de petite taille pour se lier à CR3 et induire Syk, et (ii) les cellules épithéliales alvéolaires qui n'expriment pas CR3 sont capables d'induire un signal médié par LacCer suite à la liaison du BG [265]. Il est donc possible que LacCer puisse collaborer avec d'autres protéines (des intégrines?) pour induire l'effet observé.

I.4.1.1.3 Les récepteurs Scavenger (SR)

Les récepteurs Scavenger exprimés à la surface des cellules myéloïdes et des cellules endothéliales constituent un groupe hétérogène de glycoprotéines comprenant deux domaines transmembranaires, deux domaines intracellulaires et un domaine extracellulaire [231,304]. Comme discuté dans la section *Les PRR (Pattern Recognition Receptors)*, ils reconnaissent une large gamme de molécules, des lipoprotéines à faible et haute densité (LDL et HDL respectivement) et autres ligands poly-anioniques, de même que les cellules étrangères ou apoptotiques (Tableau I-10). Bien qu'un récepteur spécifique n'ait pas été identifié, les SR sont impliqués dans la reconnaissance de $\beta(1,3)$ -glucanes et notamment du Lentinan et du Zymosan [231,305].

Récemment, CD36 et SCARF1 ont été identifiés comme pouvant jouer le rôle de PRRs pour *C. albicans* et *C. neoformans*, et être responsables de la production de cytokines selon une voie d'activation qui n'est pas encore connue [306]. En réponse à ces levures pathogènes, CD36 est indispensable à la synthèse d'IL-1 β , TNF α , IL-12p40, MIP-2, MIP-1 α , MIP-1 β et CCL5 (RANTES). En effet, l'absence de CD36 augmente la sensibilité de l'hôte aux infections systémiques par *C. neoformans* chez qui ces productions sont diminuées.

Plusieurs voies de signalisation sont liées à l'activation des récepteurs SR, incluant la famille des kinases src, PI3K, Akt et p38 MAPK, ainsi que eNOS, la nitric synthase endothéliale [304,307] (Figure I-31). Cependant, leur possible et éventuel rôle dans l'induction d'une réponse induite par les BG n'est pas établi à ce jour et aucune preuve de leur implication n'est disponible [6]. Une étude a révélé l'existence d'un SR capable de se lier au BG, le CD5 qui est exprimé à la surface des cellules T et B humaines et associé au récepteur de l'antigène [308]. Le domaine extracellulaire de CD5 est composé de trois répétitions d'un domaine SRCR (Scavenger Receptor Cystein-Rich), qui entre dans la composition d'un autre SR connu, MARCO (Macrophage Receptor with Collagenous structure ou CD204) impliqué dans la reconnaissance microbienne [309].

L'étude a par ailleurs révélé que le domaine extracellulaire de CD5 pouvait se lier spécifiquement aux BG du Zymosan avec une affinité élevée, et a la capacité d'agréger les parois de certains champignons comme *C. albicans*. De plus, cette liaison entraîne l'activation de p38 MAPK et ERK (extracellular regulated kinase) ainsi que la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-8. Cependant, il reste à définir si le CD5 murin se caractérise par des propriétés de liaison et d'activation de voies de signalisation similaires au CD5 humain.

I.4.1.2 Dectin-1

Dectin-1 a été décrit pour la première fois dans les années 2000 comme un récepteur spécifique des cellules dendritiques, i.e. Dendritic Cell-specific receptor, qui interagit avec un ligand endogène présent sur les cellules T, le CD3 [310]. Le criblage d'une librairie d'expression d'ADNc de macrophage a permis d'identifier le Zymosan et la levure vivante *Candida albicans*, comme des ligands de Dectin-1 [311]. Cette découverte a permis de confirmer que les BG peuvent moduler le système immunitaire via Dectin-1 [312]. En tant que récepteur CLR (Figure I-10), Dectin-1 se lie aux BG contenant des liaisons $\beta(1,3)$ et $\beta(1,6)$, les polyosides les plus abondants de la paroi des champignons, avant de les internaliser [80].

Dectin-1 peut également reconnaître des plantes, des champignons pathogènes (*Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Coccidioides spp.* et *Pneumocystis spp.*) et des bactéries pathogènes comme les mycobactéries [76]. Dectin-1 n'est pas seulement impliqué dans l'immunité antifongique mais également dans la phagocytose, la cytotoxicité et la production de cytokines (Tableau I-10) [313].

I.4.1.2.1 Structure moléculaire du récepteur

Dectin-1 (CLEC7A) est un CLR transmembranaire de type II, structurellement classifié dans le même sous-groupe de CLR que les récepteurs NK [76]. Ce récepteur est constitué de 247 acides aminés et contient trois régions majeures, un domaine de reconnaissance des glucides du type C-type lectin-like extracellulaire (CRD ou CTLD), une courte tige (stalk region), une région transmembranaire de type II et un domaine cytoplasmique de 40 acides aminés, qui contient un motif ITAM (Immunoreceptor- Tyrosinase-based Activation Motif) [310,312] (Figure I-32).

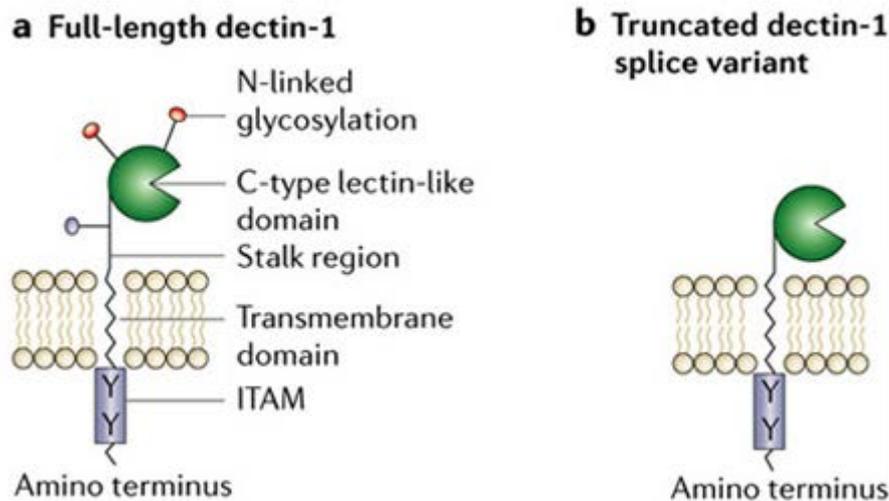


Figure I-32: La structure de Dectin-1, d'après [76].

Dectin-1 est un récepteur lectin-like de type C de type II, composé d'un CRD (Carbohydrate-Recognition Domain) extracellulaire séparé de la membrane par une tige (stalk region), absente chez l'isoforme fonctionnelle humaine en raison d'un épissage alternatif. La région cytoplasmique de Dectin-1 contient un motif ITAM (immunoreceptor-based activation motif) responsable de l'activation des voies de signalisation intracellulaire. Dectin-1 présente également des sites de glycosylation N-linked sur le CRD (représenté en rouge chez la souris) ou sur la tige (représenté en bleu chez l'homme). b : La version humaine de Dectin-1 contient également une variante du récepteur où la région de la tige est manquante.

La structure du récepteur et notamment l'association des CTLD peut être consolidée par la formation de trois ponts disulfure entre six résidus conservés de cystéine [309]. En plus de cette caractéristique structurale, l'interaction BG-Dectin-1 est assurée par la présence essentielle de deux acides aminés Tyr221 et His223 dans le CRD [314].

Un épissage alternatif détermine la présence ou l'absence de la région de jonction depuis la membrane jusqu'au CTLD, et qui est à l'origine des isoformes multiples (Figure I-33). Bien que les différences fonctionnelles sous-jacentes à chaque isoforme ne soient pas clairement définies, dans l'espèce murine, des fonctions spécifiques ont été associées à certaines isoformes [315,316]. Des analyses d'expression au niveau transcriptionnel ont révélé l'expression d'au moins deux isoformes de Dectin-1 (en fonction de l'épissage ou non de l'exon 3), qui codent pour la version longue Dectin-1A (Figure I-32a) et la forme dite tronquée Dectin-1B (Figure I-32b) qui sont identiques sur les plans structurel et fonctionnel aux deux isoformes les plus répandues chez l'homme, BGR-A et BGR-B (parmi les 8 isoformes décrites [317]) [283].

Les analyses de séquence ont montré que Dectin-1 humain partage 60% de séquences identiques et 71% d'homologie de séquence avec son homologue murin. Malgré une évidente conservation fonctionnelle des gènes entre les deux espèces, il existe une différence notable.

Le CRD murin présente deux sites de glycosylation N-linked alors que Dectin-1 humain ne dispose que d'un seul site localisé sur la région de la tige qui est absente dans l'isoforme B. Les isoformes A et B ont des capacités de liaison au Zymosan différentes et donc l'activation cellulaire telle que la production de cytokines n'est pas la même. Ainsi, certaines souches murines telles que BALB/c et DBA/2 qui expriment les deux isoformes en proportions similaires produisent davantage de TNF α et d'IL-6 en réponse au Zymosan et sont plus résistantes aux infections par *Coccidioides* par rapport aux souches murines relatives au fond génétique C57Bl/6 qui expriment principalement la version tronquée du récepteur [315,316]. Il existe peu de données sur les isoformes C-H de Dectin-1 humain mais elles ne semblent pas fonctionnelles contrairement aux isoformes A et B en raison de l'introduction de codons Stop aléatoirement à la suite de l'épissage alternatif (Figure I-33) [317].

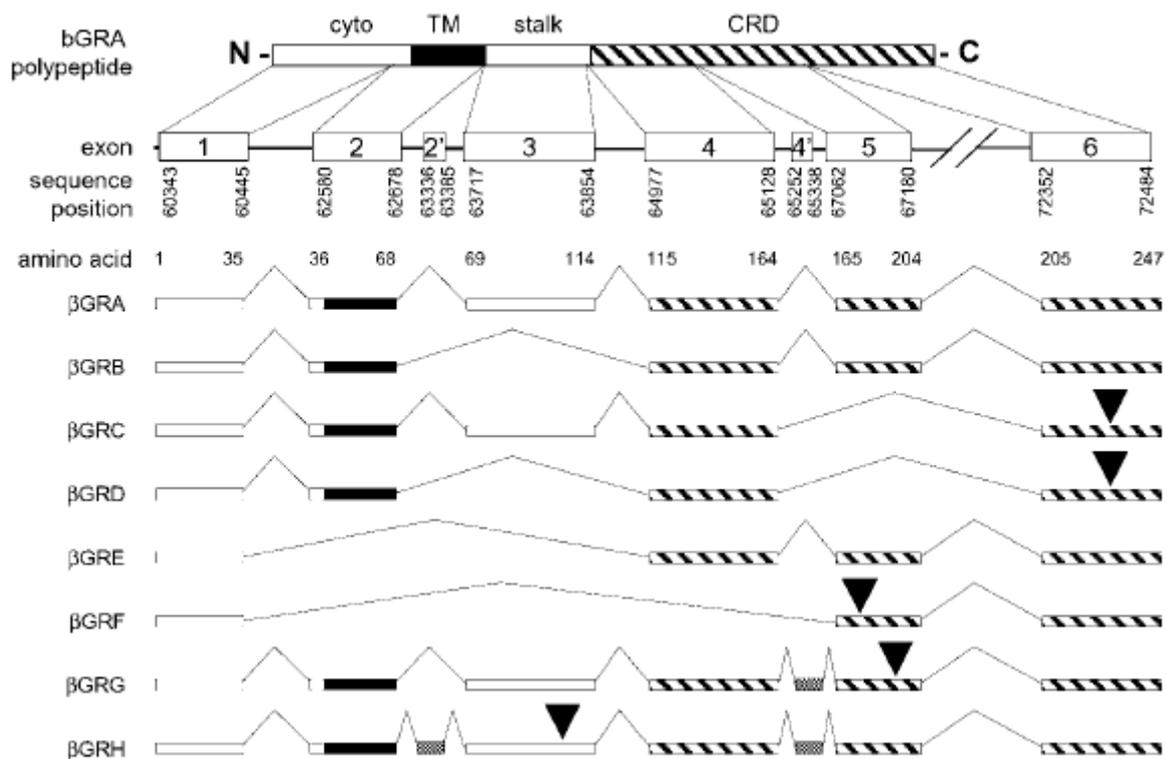


Figure I-33: Les isoformes résultant de l'épissage alternatif du récepteur Dectin-1 humain [317].

La structure génomique du récepteur humain (chromosome 12 chez l'homme, chromosome 6 chez la souris) est alignée avec le polypeptide bGRA et montre les différents exons (boîtes numérotées), les contigs correspondant et les positions des séquences. Des épissages prédits et alternatifs résultent différentes isoformes qui sont représentées dans cette figure. Les flèches correspondent à l'emplacement des codons stop introduits par l'épissage. Cyto, queue cytoplasmique ; TM, région transmembranaire.

I.4.1.2.2 Distribution et régulation de l'expression de Dectin-1

Dectin-1 est exprimé essentiellement par les cellules myéloïdes qui incluent les DC, les macrophages et les neutrophiles et une sous-population de cellules T isolées de la rate chez la souris [318]. Son expression a également été décrite sur d'autres types cellulaires telles que les cellules T, les mastocytes et les éosinophiles chez l'homme, bien que cette expression soit absente chez la souris [76,319,320]. Les macrophages alvéolaires et les monocytes inflammatoires expriment des niveaux particulièrement élevés de Dectin-1 par rapport aux macrophages péritonéaux résidents, ce qui suggère le rôle de ce récepteur dans la surveillance immunitaire [318]. De plus, certaines études basées sur des marquages d'immuno-histologie ont montré une hétérogénéité considérable de l'expression de Dectin-1 dans les populations de DC chez la souris.

Les cellules qui expriment fortement Dectin-1 sont localisées dans les sites qui constituent des interfaces favorables au contact avec les agents pathogènes, notamment la peau, les poumons, le palais et le tractus digestif [321]. On peut également trouver des cellules exprimant Dectin-1 dans les sites de présentation antigéniques riches en lymphocytes T, comme les nœuds lymphatiques, et les autres organes lymphoïdes tels que la rate, le thymus et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses nasales (O-NALT) (Figure I-34).

L'expression de Dectin-1 peut être significativement modulée par les conditions de maturation cellulaire, la présence de facteurs microbiens, de cytokines et des composés qui modifient la réponse biologique tels que les stéroïdes et les BG [283,317,321–323]. En effet, plusieurs études ont montré que la transcription de Dectin-1 est activée par le GM-CSF [322,324]. Par ailleurs, l'augmentation de l'expression de Dectin-1 est observée en présence de cytokines qui induisent l'activation des macrophages, comme l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-23 [322]. Dans les cellules épithéliales des voies aériennes, *Mycobacterium tuberculosis* induit l'expression de Dectin-1 avec la phosphorylation de Src et stimule la réponse immunitaire innée [325]. Des études pharmacologiques et génétiques ont récemment mis en évidence que l'expression de Dectin-1 peut être amplifiée dans les macrophages par la production de leucotriène B4 (LTB4) grâce à sa forte affinité avec son GPCR (G-protein coupled receptors), le BLT1 (Leucotriène B4 receptor) [324]. Ainsi l'interaction LTB4-BLT1 module le niveau d'expression de Dectin-1 avec comme conséquence la mise en place d'une réponse protectrice de l'hôte contre les infections fongiques.

En revanche, l'expression de ce récepteur est inhibée par l'IL-10, le LPS et les corticostéroïdes (Dexaméthasone par exemple) [322] et également via PPAR γ (peroxysome proliferator-activated receptor- γ) [326].

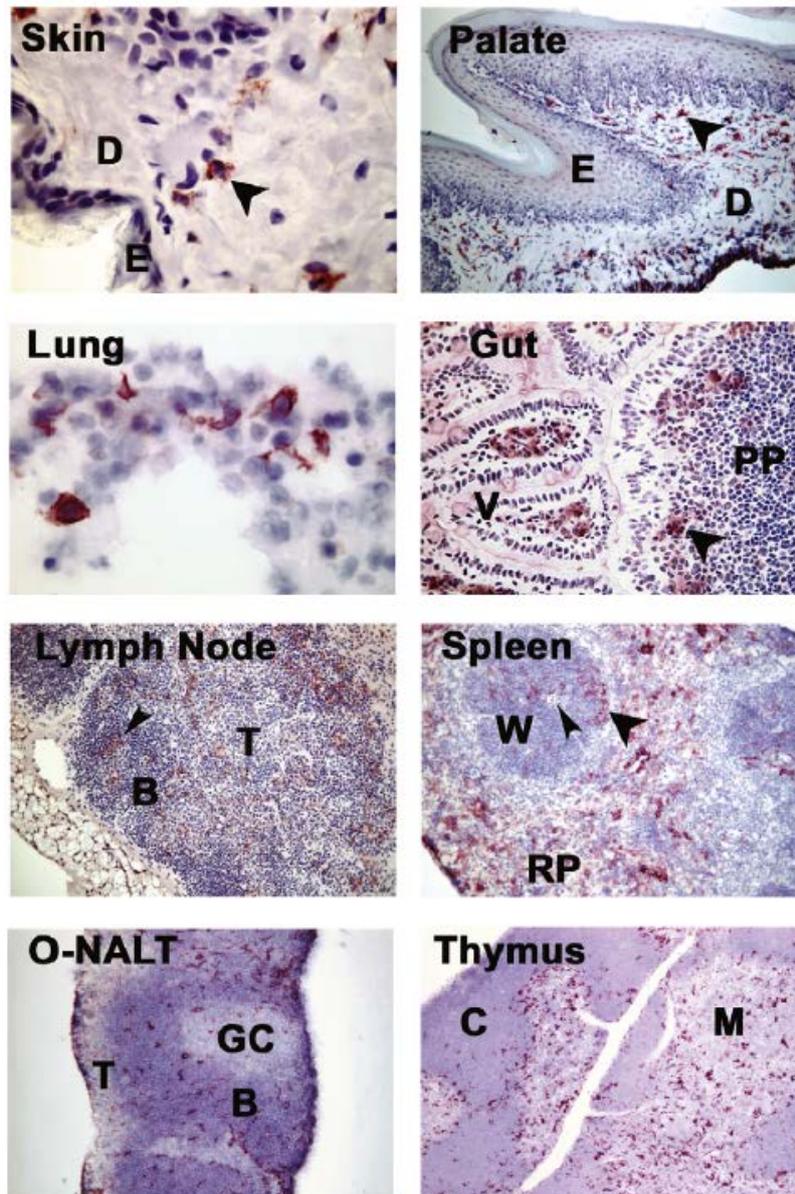


Figure I-34: Localisation des cellules exprimant Dectin-1 aux portes d'entrée des agents pathogènes [82].

Les cellules exprimant Dectin-1 sont principalement présentes à proximité des zones contact avec les agents pathogènes et les sites de multiplication des cellules T (follicules), avec notamment les couches dermiques de la peau et du palais (D, flèche), les APC pulmonaires et du tractus digestif (villosités, V et plaques de Peyer, PP, flèche), dans les tissus lymphoïdes tels que les centres germinaux des nœuds lymphatiques (petite flèche), autour de l'artériole centrale de la pulpe blanche de la rate (W, petite flèche), dans les tissus lymphoïdes associés aux voies respiratoires (O-NALT) organisés de la même façon que les nœuds lymphatiques, et dans le thymus au niveau des régions de la jonction cortico-médullaire. E, épiderme ; D, derme ; B, B cell area ; T, T cell area ; GC, germinal center ; C, cortex ; M, medulla.

I.4.1.2.3 Voie de signalisation associée à Dectin-1

Suite à la stimulation par son principal ligand, le $\beta(1,3)$ -glucane, Dectin-1 active une voie de signalisation intracellulaire via son motif ITAM-like ; c'est le premier PRR non TLR chez lequel cette propriété a été identifiée [76]. Cette activation est à l'origine de réponses cellulaires variées qui incluent l'explosion respiratoire, la maturation des DC, l'internalisation du ligand grâce aux processus de phagocytose et d'endocytose, la production de métabolites issus de l'acide arachidonique et de nombreuses cytokines et chimiokines telles que TNF α , CXCL2, IL-23, IL-6, IL-2 et IL-10 [82] (Tableau I-10). Ces dernières années, de nombreuses études se sont focalisées sur l'identification des voies de signalisation induites par Dectin-1 et à l'origine d'une grande variété de réponses cellulaires. De premier abord, la mise en place d'une étude traditionnelle linéaire des voies de signalisation qui paraissait évidente s'est révélée plus complexe après identification de certaines collaborations et des divers branchements existants entre les différentes voies [80]. Cette situation se révèle particulièrement vraie dans le cas de Dectin-1, qui parfois peut induire une réponse directe, mais qui dans d'autres cas, requiert la collaboration de MyD88-TLR.

Un degré de complexité supplémentaire a été mis en évidence lorsqu'il a été montré que les signaux émanant de Dectin-1 varient entre les différents types de cellules myéloïdes [317,327,328].

Lorsque le CRD de Dectin-1 se lie aux BG particulières, un complexe multimérique s'assemble et permet la dispersion des phosphatases CD45 et CD148 de leurs emplacements originaux (Figure I-35). Cela entraîne la libération de l'espace pour une association optimale du ligand à son récepteur [329]. Une fois la liaison établie, l'hémi-ITAM de Dectin-1 est phosphorylé par Src (non-receptor tyrosine kinase) ce qui entraîne le recrutement de Syk (Spleen tyrosine kinase) vers le domaine cytoplasmique ainsi que la cascade de signalisation médiée par Syk (Figure I-31). Grâce à l'activation de PLC γ (Phospholipase C γ) et de PKC (Protein kinase C), Syk initie une réponse transcriptionnelle intégrée (ITR) à l'origine de deux voies de signalisation clé. L'activation de PKC induit l'activation des facteurs de transcription NFAT et AP-1 impliqués dans l'expression de cytokines [80,330] (Figure I-35). Par ailleurs, PLC γ également activé par Syk induit la calcineurine qui entraîne la translocation de NFAT. Dectin-1 est également capable d'induire un signal de transduction indépendant de Syk [331].

Il existe deux voies de signalisation majeures induites par Dectin-1, qui dépendent du mode de propagation du signal via Syk ou non.

Dans le cas de BG solubles ou d'absence de liaison, CD45 et CD148 ne peuvent être exclues ce qui déphosphoryle le domaine hémi-ITAM et aboutit à la production d'un signal faible voire à l'absence de signal.

I.4.1.2.3.1 Signaux dépendant de Syk

I.4.1.2.3.1.1 Activations Classique et Alternative de NFκB et autres facteurs de transcription

La capacité des CLRs couplés à Syk à fonctionner comme des PRRs repose sur leur aptitude à activer NFκB en aval de Syk. L'activation **canonique** ou **classique** de NFκB requiert la protéine adaptatrice CARD9 (Caspase recruitment domain 9) [83]. Cette protéine est rapidement mobilisée vers le phagosome qui contient la particule internalisée et probablement vers la membrane plasmique, puisque l'internalisation du récepteur semble être associée à la modulation de l'inflammation [327,328,332].

CARD9 recrute ensuite Bcl-10 (B cell lymphoma-10) et Malt1 (Mucosal-associated lymphoid tissue lymphoma translocation protein-1) pour former un complexe (CBM) à l'origine de l'activation via TRAF2 ou TRAF6 d'un second complexe IKK/NEMO (Inhibitor of κB kinase/ NFκB essential modulator) qui phosphoryle IκB, ce qui provoque leur ubiquitination et leur dégradation. Ceci permet donc aux membres de la famille NFκB de se transloquer vers le noyau et d'activer la transcription des gènes [83] (Figure I-35).

Initialement, Syk phosphoryle PLCγ2 à l'origine de la synthèse de DAG (diacylglycerol) et d'IP3 (inositol-1, 4,5-triphosphate) à partir de PIP3 localisé à proximité de la membrane plasmique [333]. La présence de DAG ou d'IP3 détermine la suite du processus. Lorsque le messenger est le DAG, PKC est immédiatement activée et induit le complexe CBM [334]. En revanche, la mobilisation d'IP3 est à l'origine de l'activation de NFAT, un autre facteur de transcription. Brièvement, IP3 provoque la libération des ions calcium dans le compartiment cytosolique qui induisent la déphosphorylation de NFAT par la calcineurine et sa translocation vers le noyau [333,335–337]. NFAT est un élément particulièrement important de la signature de la voie de signalisation de Dectin-1 puisqu'il n'est pas induit pas l'engagement des TLRs, et conduit à la production de quantités significatives de COX-2 et de PGE2 dans les macrophages (d'IL-2, d'IL-23 et d'IL-10 dans les DCs) [336].

Par ailleurs, le complexe CBM induit par l'interaction BG/Dectin-1, initie une seconde voie de signalisation (en parallèle de NFκB), celle des MAP et PI3 (Phosphoinositide-3) kinases qui sont à l'origine de l'activation d'un troisième facteur de transcription, AP-1.

Brièvement, les MAPK phosphorylent ERK, JNK et p38 qui migrent vers le noyau et se fixent aux éléments transcriptionnels d'AP-1 [125,338,339] (Figure I-35).

En plus d'activer NFκB par la voie canonique, Dectin-1 peut également induire l'activation Syk-dépendante de NFκB par une voie **alternative**. De façon inédite, cette voie **non canonique** indépendante de CARD9 permet l'activation successive de NIK (NFκB-inducing kinase) et d'IKKα qui provoque la translocation du dimère RelB-p52 [331,340]. A noter que l'activation de cette voie non canonique n'avait été identifiée uniquement que pour quelques membres de la superfamille des récepteurs TNF mais reposait sur un mécanisme indépendant de Syk [80].

Les différentes régulations de l'axe Syk-NFκB peuvent expliquer pourquoi certains CLRs couplés à Syk montrent des capacités d'activation de NFκB variables. Récemment, la voie de signalisation de Dectin-1 via CARD9 s'est révélée être variable suivant les types de cellules myéloïdes, conduisant à la production de données contradictoires [327,328]. En effet, l'activation de NFκB serait corrélée à la quantité de CARD9 exprimée par le type cellulaire mais certaines cellules comme les macrophages et les macrophages inflammatoires (recrutés sous l'action du thioglycollate) semblent être capables de produire des inhibiteurs de cette voie de signalisation [327]. Cette régulation cellulaire spécifique pourrait donc expliquer pourquoi le signal issu de Dectin-1 soit suffisant à la production de TNFα médiée par NFκB dans certains types cellulaires alors qu'il requiert la collaboration d'autres récepteurs dans d'autres (cf. section suivante).

I.4.1.2.3.1.2 Production des ROS

Dans les macrophages, Syk peut également contrôler les événements se produisant dans les phagosomes. L'activation de Dectin-1 induit la production Syk-dépendante de ROS (Reactive Oxygen Species), qui contribuent à l'activité microbicide du phagosome [266,267,341]. Les ROS sont produits par la NADPH oxydase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate), une enzyme composée de multiples sous-unités qui s'assemblent directement sur la membrane phagosomale (Figure I-35).

Une mutation délétère sur ce complexe chez l'homme et la souris entraîne une sensibilité accrue aux infections bactériennes et fongiques [61] ainsi qu'une inhibition de l'explosion respiratoire induite par le Zymosan chez les souris déficientes pour Dectin-1 [263,285].

De même, une réduction de l'expression de Dectin-1 par interférence de l'ARN dans les macrophages supprime la synthèse de ROS provoquée par le Zymosan [336,341].

En revanche, certaines études décrivent des résultats variables ce qui montre que la contribution spécifique de Dectin-1 dans la production de ROS reste à établir. En effet, Taylor et al ont suggéré que le rôle majeur de Dectin-1 dans la synthèse de ROS reposait sur la reconnaissance de la levure puisque la levure opsonisée induit la production de ROS dans les macrophages n'exprimant pas Dectin-1 [285]. De plus, Saijo et al n'ont décrit aucune altération de la production de ROS induite par *C. albicans* dans ces macrophages [263]. Alors que les réponses des neutrophiles et des macrophages alvéolaires au Zymosan opsonisé sont altérées par la délétion de Dectin-1, celle des macrophages inflammatoires recrutés sous l'action du thioglycollate ne semble pas affectée.

Il s'avère ainsi que la contribution relative des BG, de Dectin-1, de CR3 ou d'autres récepteurs pour la production de ROS dépendent du type cellulaire analysé. Par ailleurs, la production de ROS est régulée par PKC qui contrôle la NADPH oxydase, limitant ainsi l'excès de ROS, les dommages tissulaires associés et l'inflammation chronique [342].

1.4.1.2.3.1.3 Induction de l'inflammasome

La production de ROS induite par l'activation de Dectin-1 via Syk peut contribuer à la production d'IL-1 β . Alors que l'axe Syk-CARD9-NF κ B active la synthèse de pro-IL-1 β , Syk peut activer l'inflammasome NLRP3 de façon ROS-dépendante, à l'origine de la maturation d'IL-1 β sous l'action de la caspase-1 [343] (Figure I-35). Les ROS migrent vers le complexe inflammasome NLRP3, et activent la caspase-1 qui convertit la pro-IL-1 β en IL-1 β [341,343–345]. Les souris NLRP3^{-/-} sont particulièrement sensibles aux infections causées par des champignons pathogènes (dont *C. albicans*), démontrant le rôle crucial de cette cytokine dans l'immunité antifongique. Ces études suggèrent qu'en régulant la production d'IL-1 β , la voie Dectin-1-Syk peut assurer la résistance de l'hôte aux infections indépendamment de l'induction de ces gènes.

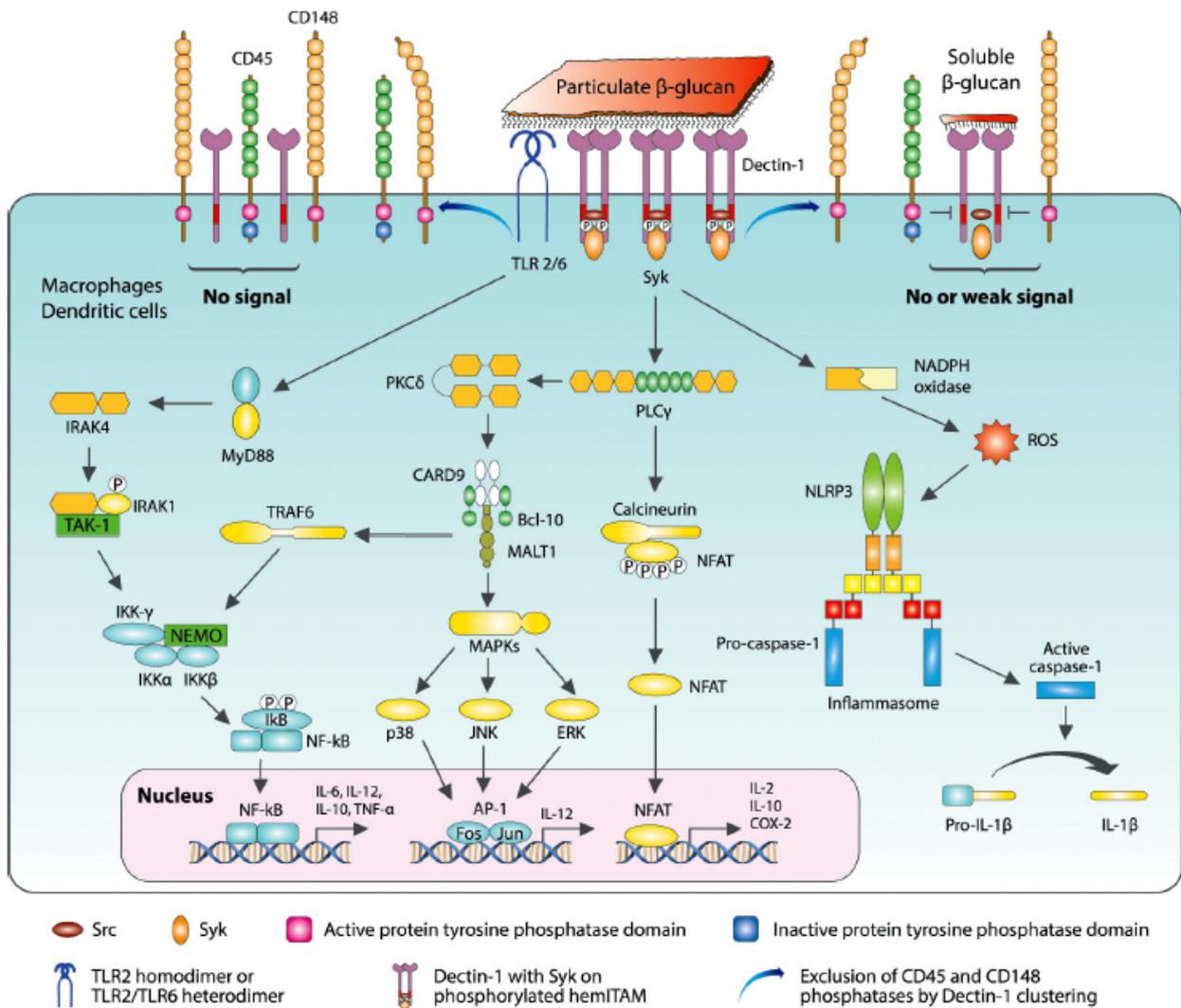


Figure I-35: La reconnaissance des BG particulaire et soluble par Dectin-1 et les signaux de transduction associés dans le macrophage et la cellule dendritique [342].

I.4.1.2.3.1.4 Initiation de l'immunité adaptative

Grâce à la production d'IL-1 et d'IL-23, l'engagement de Dectin-1 par les BG favorise la différenciation des cellules impliquées dans la réponse Th17 [124]. Notamment, l'utilisation d'adjuvants contenant des agonistes de Dectin-1 *in vivo* promeut la réponse Th17. Cette réponse T de type 17 naturellement développée lors d'infections expérimentales à *Candida albicans* dans les souris WT, était absente chez les souris invalidées pour CARD9. Ainsi la signalisation de Dectin-1 via l'axe Syk/CARD9 peut activer la réponse Th17 indépendamment de la voie TLR [124]. Par ailleurs, IL-17A sécrétée par les cellules Th17 attire les neutrophiles sur le site inflammatoire [169]. Ils contribuent ainsi à l'élimination des agents pathogènes par ce recrutement.

Plusieurs études ont montré l'implication de Dectin-1 dans l'initiation de la réponse T de type 17, essentielle pour la lutte contre les infections fongiques [331,346–349]. Les souris IL-17A^{-/-} sont significativement plus sensibles à une infection systémique par *C. albicans* et celles déficientes en IL-17R sont également plus sensibles à une infection oro-pharyngée par *C. albicans* [350,351].

I.4.1.2.3.2 Voie de signalisation indépendante de Syk (ou voie de signalisation Raf-1-dépendante)

I.4.1.2.3.2.1 L'activation de NFκB via Raf-1

Dectin-1 peut également induire une voie de signalisation indépendante de Syk. Dans ce cas, Raf-1 se lie au motif ITAM de Dectin-1 et active la phosphorylation de p60, permettant à terme l'activation de NFκB et donc la modulation de l'expression des gènes pro-inflammatoires [331]. Cette voie de signalisation peut représenter une alternative à la voie canonique Syk-dépendante lorsque celle-ci est bloquée, et peut même agir de façon synergique lors de la reconnaissance des BG. En combinaison avec le signal induit par Dectin-1, le dimère TLR2/TLR6 peut être activé par les BG ou les préparations contenant des BG, conduisant à l'activation de MyD88 pour induire l'activation de NFκB, en présence ou non de Syk. La coopération de ces voies sera détaillée dans la prochaine section.

I.4.1.2.3.2.2 La phagocytose

La phagocytose dans les macrophages est un processus qui résulte également de l'activation de Dectin-1 [76,341] (Tableau I-10). Cette fonction du récepteur a été initialement mise en évidence par Brown et Gordon dans un essai spécifiquement élaboré pour identifier les récepteurs capables de phagocyter le Zymosan utilisé comme modèle [311]. Plus tard, l'utilisation d'anticorps, qu'ils soient mono- ou poly-clonaux spécifiques de Dectin-1 ainsi que l'utilisation de souris Dectin-1^{-/-} ont confirmé l'absence de phagocytose du Zymosan et de la levure *C. albicans* par le macrophage lorsque Dectin-1 est invalidé [263,266,285,297].

Malgré un mécanisme d'action assez peu caractérisé, le rôle de CARD9 dans la phagocytose a été écarté [83,352]. Bien qu'elle requière Syk dans les cellules dendritiques, il a été montré que la phagocytose était indépendante de Syk ou d'un TLR, mais qu'elle dépendait de PKC dans les macrophages [83,352,353] (Figure I-31). En effet, un système artificiel de fibroblastes (à l'origine non phagocytaires) clonés, a montré que la signalisation issue de Dectin-1 activait Cdc42 et Rac-1 qui entraînent la polymérisation de l'actine et l'extension

des pseudopodes autour de la particule [353]. Bien que le rôle de la PKC dans la phagocytose ne soit pas encore élucidé, un de ses substrats, MARKS (myristoylated, alanine-rich C kinase substrate) possède une activité actine croisée, impliquée dans la phagocytose du Zymosan [80].

Les trois acides aminés acidifiants que contient le domaine cytoplasmique de Dectin-1 sont responsable de l'internalisation de la particule de BG mais également de l'activation des endosomes et des lysosomes du phagocyte [6].

I.4.1.2.4 Relation structure/activité entre les $\beta(1,3)$ -glucanes et Dectin-1

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'interaction de Dectin-1 avec les BG dépend de sa structure. La reconnaissance des BG particuliers par Dectin-1 induit la libération de CD45 et CD148 à la surface du macrophage permettant ainsi l'initiation de différentes voies de signalisation, ce processus étant communément décrit comme une synapse phagocytaire [329] (Figure I-35). Par opposition, les BG solubles ne sont pas capables d'exclure ces phosphatases lors de leur liaison et ne peuvent donc générer qu'un faible signal de transduction.

Les propriétés physicochimiques des BG (structure primaire, tailles des polymères, conformation en solution, branchement) se sont révélées cruciales lors de leur reconnaissance par les PRRs, Dectin-1 inclus. Alors que les premières études se basaient sur des techniques et des préparations peu fiables, les études plus récentes ont fait la lumière sur l'influence de la structure des $\beta(1,3)$ -glucanes sur la reconnaissance par Dectin-1 [182,354].

Basés sur une librairie de $\beta(1,3)$ -, $\beta(1,6)$ - et de $\beta(1,3)(1,6)$ -glucanes, Adams et al ont démontré que la version murine de Dectin-1 recombinant se lie spécifiquement aux structures $\beta(1,3)$ -glucopyrannosyl incluant les $\beta(1,3)(1,6)$ -glucanes. Cependant, il ne se lie pas à tous les $\beta(1,3)$ -glucanes et $\beta(1,3)(1,6)$ -glucanes de façon équivalente. Dectin-1 peut fixer ces polymères avec des affinités variant de 3×10^{-3} M, la plus faible à 2×10^{-12} M, la plus élevée pour les $\beta(1,3)$ -oligosides contenant une chaîne latérale formée d'une unique unité glucose [182]. L'étendue de cette gamme résulte probablement de la grande diversité des structures moléculaires rencontrées parmi les BG (Tableau I-8).

Certains auteurs ont montré qu'une chaîne linéaire $\beta(1,3)$ formée d'au moins sept oligoglucosides est requise pour la reconnaissance par Dectin-1 [355], alors que d'autres sont convaincus que la liaison nécessite une structure plus complexe formée d'au minimum 10 à 11 sous-unités de glucose, sans pour autant avoir établi une valeur de l'affinité et à partir de spéculations sur un néoglucolipide [356].

Finalement, l'étude d'Adams et al (2008) révèle tout comme celle de Brown et Gordon (2001) [311] que la reconnaissance d'un BG par Dectin-1 requiert une chaîne carbonée contenant au moins sept sous-unités glucose et une chaîne latérale formée d'au moins un glucose [182].

Il convient néanmoins de distinguer taille et structure du BG nécessaires à la reconnaissance par Dectin-1 et celles requises à l'induction d'une activité biologique. En effet, un $\beta(1,3)$ -glucane possédant la structure établie par les précédentes études (8 à 11 sous-unités pour la chaîne principale et une sous-unité pour la chaîne latérale) n'a pas permis de générer un signal intracellulaire ni d'induire un effet biologique significatif lors d'une administration parentérale. Des études menées *in vivo* chez la souris suggèrent que l'activation d'une voie de signalisation associée à un effet biologique est effective suite à l'administration d'un $\beta(1,3)(1,6)$ -glucane de *S.cerevisiae* composé de plus de 70 sous-unités glucose [357]. Ainsi, il s'avère qu'en plus d'être reconnu par Dectin-1, le polymère de $\beta(1,3)$ -glucane doit avoir une taille suffisante pour pouvoir induire une activité biologique mesurable.

Compte tenu de cette assertion, et de la grande variabilité de sources et de méthodes d'extraction utilisées, qui sont des paramètres qui influencent grandement la structure des polymères de BG, il est capital de caractériser les BG pour comprendre leur mode d'action.

I.4.2 La reconnaissance des autres composants de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*

En dehors des BG reconnus entre autres par Dectin-1, de multiples PRRs incluant des CLR's et des TLRs sont impliqués dans la reconnaissance des composants de la paroi des champignons et des levures (Tableau I-11).

	Receptors
Ligands present on nearly all fungi	
1,3 β -glucans	Dectin-1
	CR3 (CD11c/CD18)
	CD5
	CD36
	SCARF1
Mannans	Mannose receptor (CD206)
	DC-SIGN (CD209)
	Langerin CD207)
	Dectin-2
Chitin	Mannose receptor (CD206)
Ligands present on only some fungi	
α -glucans of <i>Pseudallescheria boydii</i>	Dectin-2
BAD1 of <i>B. dermatitidis</i>	CR3 (CD11c/CD18)
HSP60 of <i>H. capsulatum</i>	CD18
Phospholipomannan of <i>C. albicans</i>	TLR2
O-linked mannoses of <i>C. albicans</i>	TLR4
Opsonic ligands	
C3b	CR1 (CD35)
iC3b	CR3 (CD11b/CD18)
	CR4 (CD11c/CD18)
IgG	Fc γ RI (CD64)
	Fc γ RII (CD32)
	Fc γ RIII (CD16)

Tableau I-11: Les différents PAMPs de la paroi des champignons et leurs récepteurs [176].

I.4.2.1 TLRs

Initialement identifiés grâce à leur capacité à contrôler les infections fongiques chez la *Drosophile*, les TLRs représentent la famille de PRRs la mieux caractérisée. Une section de cette revue bibliographique leur ayant été précédemment consacrée, ce paragraphe ne traitera que des interactions TLRs/PAMPs fongiques.

Cinq TLRs sont impliqués dans la reconnaissance de la plupart des agents pathogènes fongiques, le TLR2 qui forme un hétérodimère avec TLR1 ou TLR6, TLR7 et TLR9 [358].

Leur liaison aux polyosides de la paroi, ainsi qu'aux acides nucléiques, active des voies de signalisation médiées par une protéine adaptatrice centrale, MyD88 (et TRIF) à l'origine de la translocation nucléaire de certains facteurs de transcription incluant NF κ B, AP-1, NFAT et IRF3, qui vont induire la synthèse de nombreuses cytokines et chimiokines via les kinases MAPK et IKK [49] (Figure I-31, Figure I-32, Figure I-35 et Figure I-36). De plus, la délétion de MyD88 rend les souris sensibles aux infections à *C. albicans*, *C. neoformans*, *P. brasiliensis* et retarde la clairance d'*A. fumigatus*, ce phénotype étant également observé si les signaux émanant d'IL-1R sont absents [358–360]. Différents polymorphismes de TLR1 et TLR4 ont été reliés à une susceptibilité accrue de l'homme (respectivement aux candidoses et aspergilloses) en contexte d'immunosuppression [361], confirmant le rôle crucial des TLRs dans la défense de l'hôte contre les infections fongiques. Néanmoins, le rôle précis des TLRs individuels demeure mal compris, notamment en raison des données hétérogènes rapportées par la littérature. Par exemple, la déficience en TLR2 chez la souris améliore des fonctions associées à la résistance (baisse d'IL-10 et hausse d'IL-12 et d'IFN γ) mais accroît aussi certains facteurs de sensibilité à *C. albicans* (baisse des cytokines pro-inflammatoires et du recrutement des neutrophiles). Ces contradictions résultent vraisemblablement des différents modèles d'études et des souches utilisées dans les essais [358].

Bien que très peu de connaissances existent concernant la nature des PAMPs fongiques reconnus par les différents TLRs, il s'avère que TLR4 participe à la reconnaissance de structures de type mannane, incluant les glucuronoxylomannanes (GXM) de *Cryptococcus neoformans*, les O-linked mannanes de *C. albicans* ainsi que les mannanes de *S. cerevisiae*, et qui participent à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que TNF α [85,173,362]. TLR7 et 9 se lient aux acides nucléiques, respectivement les ADN et les ARN fongiques [85,359,363,364]. Enfin, TLR2 reconnaît les BG de certaines espèces fongiques [173,268], le phospholipomannane (PLM) unique de *C. albicans* et les résidus N-acétylglucosamine (chitine) similaires au LTA (acide lipotéichoïque) [181,365]. Les hétérodimères associés à TLR2 se lient tout comme TLR4, aux GXM de *Cryptococcus neoformans* [366]. Les voies de signalisation des TLRs ont été détaillées dans la section correspondante.

I.4.2.2 MR

Le mannose receptor (MR ou CD206) est un CLR transmembranaire comprenant trois domaines de reconnaissance distincts reliés à un unique domaine transmembranaire et à un court motif cytoplasmique [78]. Le domaine N-terminal riche en cystéine qui lie les sucres sulfatés est suivi d'un domaine FNII (Fibronectin type II) et de 8 domaines C-type lectin-like (CTLD1-CTLD8) (Figure I-10). A noter que seuls CTLD4 et CTLD5 possèdent une activité dépendante du calcium.

MR est fortement exprimé par les macrophages activés par la voie alterne (« Macrophages polarisés M2 ») et les endothéliums ; il est par contre absent dans les DC [367]. Capable de reconnaître de nombreuses espèces fongiques telles que *Cryptococcus neoformans*, *C. albicans* et *Pneumocystis*, il est considéré comme le récepteur majeur des mannanes et en particulier des N-linked mannanes [173,176] (Tableau I-11). MR est également impliqué dans la reconnaissance de résidus fucose, d'oligosaccharides terminés par des GlcNAc tels que la chitine, ainsi que d'oligomannosides α -branchés [85].

Son motif cytoplasmique dirige les antigènes mannosylés vers l'endosome où ils peuvent être apprêtés par les APC en vue de leur présentation aux cellules T. La stimulation du MR induit la phagocytose grâce à la polymérisation de l'actine F, Cdc42 et MARKS [181] et peut aboutir à la production de cytokines pro- ou anti-inflammatoires suivant le ligand reconnu et la cellule hôte concernée. En réponse à *Pneumocystis* et à *Cryptococcus neoformans*, MR active NF κ B ce qui conduit à la synthèse de GM-CSF, MCP-1, IL-12, IL-6, IL-10 et IL1 β [86] alors que sa liaison à *C. albicans* inhibe la production de TNF α [85].

I.4.2.3 Autres Lectines

Les CLRs individuels sont capables de reconnaître une large gamme de champignons et levures ; il existe une redondance évidente de substrats entre certains d'eux. En dehors de MR, d'autres CLRs membranaires et extracellulaires incluant Dectin-2, Dectin-3, DC-SIGN, MBL (Mannose-Binding Lectin), Mincle et Langerin, et la Lectine de type S Galectin-3, sont capables de reconnaître des structures de parois de champignons [125,176,334] (Tableau I-11 et Figure I-36). Ces récepteurs sont capables de se lier à une grande variété de structures de type mannane, et ont un rôle important dans l'immunité antifongique en contribuant à la liaison, l'ingestion et la clairance des pathogènes par l'initiation et la modulation de la réponse immunitaire.

Le **DC-SIGN** humain (Dendritic Cell Specific ICAM-3-grabbing non-integrin ou CD209) est l'équivalent fonctionnel de MR exprimé sur les DC, et reconnaît les $\alpha(1,2)$ -N-linked mannanes et plus largement *C. albicans*, *A. fumigatus* et *C. neoformans* [177,368]. En tant que CLR, DC-SIGN est composé d'un CTLD extracellulaire, d'une région « stalk » qui autorise la multimérisation du récepteur, et d'un domaine cytoplasmique contenant des motifs d'internalisation. Il existe plusieurs homologues murins du récepteur dont **SIGNR1**, **SIGNR3** et **Langerin** sont les seuls à pouvoir reconnaître les champignons et le Zymosan [369,370]. En réponse à son ligand, DC-SIGN peut activer la voie Raf-1 kinase et conduire à l'activation de NF κ B mais uniquement après l'induction de la voie TLR [371] (Figure I-36). DC-SIGN et SIGNR1 ne semblent pas capables d'induire directement la production de cytokines et ne contribuent pas à la phagocytose dans les macrophages [370].

Mincle (Macrophage-Inducible C-type Lectin ou Clec4e) est un autre CLR exprimé par les macrophages. Il est impliqué dans la reconnaissance des mannanes de *C. albicans*. Indispensable à la stimulation de TNF α *in vivo* et *in vitro*, Mincle ne semble pas essentiel au processus de phagocytose [372] (Figure I-36). Bien que la nature exacte de ce récepteur soit encore inconnue, son importance dans le développement d'une réponse contre *Candida* est soulignée par l'augmentation de la sensibilité aux candidoses systémiques lorsque Mincle est absent chez la souris.

De façon similaire à Mincle, **Dectin-2** et **Dectin-3** sont des récepteurs transmembranaires de type II formés d'un CRD extracellulaire, d'une région « stalk » et dépourvus de motif de signalisation intracellulaire. Malgré son nom, Dectin-2 ne présente que 20 à 25% d'homologie avec Dectin-1 [373]. Dectin-2 et Dectin-3, exprimés à la surface des macrophages et des DC reconnaissent les α -mannanes présents dans la paroi d'un grand nombre d'agents pathogènes incluant *C. albicans* sous leur forme hyphale [176,374,375]. Suite à la liaison avec un ligand, Dectin-2 ou Mincle peuvent s'associer au motif ITAM de Fc γ R et induire la production de nombreuses cytokines dont TNF α , IL-1Ra, IL-2, IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-12 et IL-23 [358] (Figure I-38). La déficience en Dectin-2 (ou en Dectin-3) est associée à une hypersensibilité à *C. albicans* vraisemblablement en raison d'un défaut d'induction de la réponse adaptative de type Th17 [166,373]. Dectin-2 et Dectin-3 peuvent également former des hétérodimères afin d'augmenter l'efficacité de la réponse anti-fongique.

Galectin-3 se lie aux $\beta(1,2)$ -mannosides spécifiquement présents sur la couche extérieure de la paroi de *C. albicans* et entraîne la production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages [214] (Figure I-36).

L'activation de ce récepteur contribue ainsi à la discrimination entre *C. albicans* et *S. cerevisiae*. Cependant, il se pourrait que ce ne soit pas le cas des PBMCs humains qui induisent le même niveau de cytokines en présence ou non de $\beta(1,2)$ -mannosides [177].

Le **MBL** (Mannose-Binding Lectin) est un CLR soluble produit par le foie et exprimé dans divers organes (estomac, intestin) qui peut lier *C. albicans* et *A. fumigatus* (Figure I-10) [85]. Cette protéine calcium-dépendante oligomérique joue un rôle majeur dans la défense de l'hôte contre les infections fongiques en raison de sa capacité à opsoniser les levures donc à activer le système du complément, ainsi que la phagocytose des micro-organismes par les phagocytes [376,377]. Bien que la déficience en MBL chez les souris n'altère pas leur survie aux infections à *C. albicans* ou à *A. fumigatus*, l'administration de MBL en modèle d'infection invasive à *Aspergillus* peut être protectrice [85]. De plus, l'inactivation de MBL chez la souris entraîne la surexpression de l'IL-17 et de l'IL-23, cytokines impliquées dans la réponse T de type 17, ainsi que des récepteurs TLR4 et Dectin-1 [377].

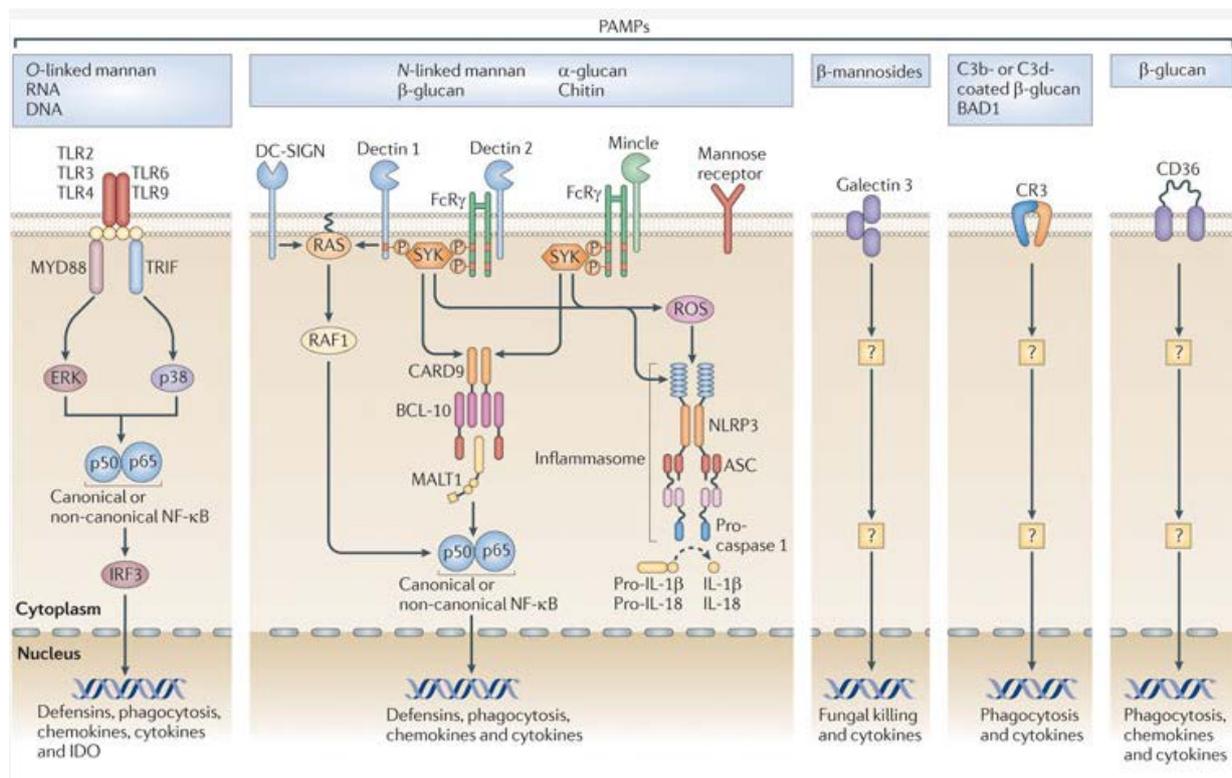


Figure I-36: Les voies de signalisation des récepteurs impliqués dans la reconnaissance des composants des parois fongiques [378].

I.4.3 Coopération entre PRRs et reconnaissance des extraits de parois de levure

Les agents pathogènes contiennent de multiples PAMPs et engagent par conséquent plusieurs récepteurs en même temps ou séquentiellement au moment du contact avec les cellules de l'organisme. Les signaux émanant des PRRs sont intégrés pour permettre le développement d'une réponse immunitaire visant à assurer le contrôle de l'infection et la réparation tissulaire.

La coopération des PRRs peut aboutir à l'augmentation ou à l'abrogation de la réponse immunitaire. Le dialogue des PRRs par opposition à leur fonctionnement individuel est une facette importante du contrôle de l'infection [60,379].

Ce postulat est particulièrement vrai pour Dectin-1 pour lequel il a été démontré qu'il collabore avec de nombreux récepteurs TLRs, CLR et d'autres protéines membranaires pour promouvoir des réponses antifongiques et antibactériennes efficaces [173].

I.4.3.1 Coopération entre Dectin-1 et les TLRs

Initialement, le rôle de Dectin-1 dans l'immunité a été attribué à sa capacité à collaborer avec TLR2, TLR1 et TLR6 pour provoquer la synthèse de cytokines pro-inflammatoires dont TNF α dans les macrophages stimulés au Zymosan [54,84,380]. Ce stimulus conduit également à la phagocytose et à la production de ROS. En réponse aux levures vivantes, Dectin-1 intensifie l'activation de NF κ B permise par TLR2.

La collaboration de Dectin-1 et de TLR2 dépend du type cellulaire. Dans les macrophages, Dectin-1 seul ne semble pas induire la production de cytokines et la signalisation de TLR2 n'aboutit pas à la phagocytose ni à la production de ROS. Ce n'est donc que lorsque les deux récepteurs sont engagés que le macrophage s'active, confirmant la nécessité de stimuler simultanément CLR et TLR pour mettre en place une réponse optimale [84] (Figure I-37). Dans les DC, l'engagement de Dectin-1 seul peut conduire à la production de TNF α et d'IL-10, et la coopération avec un TLR amplifie cette réponse [125,379]. Dans les macrophages, il a été démontré que la kinase Syk induite par Dectin-1 est requise pour l'amplification du signal des TLRs, ce qui entraîne la dégradation prolongée d'I κ B et l'augmentation de la translocation nucléaire de NF κ B [379]. Plus précisément, Dectin-1 peut interagir avec plusieurs TLRs couplés à MyD88 (TLR4, TLR5, TLR7, TLR9) pour produire de nombreuses cytokines de façon synergique dont TNF α , IL-10, IL-23 et IL-6 [82,285,381].

Malgré de nombreuses controverses, il semblerait que le signal issu du TLR ne joue aucun rôle dans l'augmentation de la phagocytose, ni dans celle de la production des ROS, toutes deux induites par Dectin-1 [61] (Figure I-37).

La production de médiateurs lipidiques est également une conséquence de l'activation des macrophages par le Zymosan et par d'autres agents pathogènes, sachant que TLR2 et Dectin-1 collaborent lors de leur induction. En effet, l'utilisation d'agonistes de TLR2, faibles inducteurs d'AA, amplifie la libération d'acide arachidonique à partir des membranes, provoquée par l'action de BG particulières sur Dectin-1 dans les macrophages péritonéaux. Par ailleurs, la production de COX-2, requise pour la production des PG et des prostanoides, qui est induite par le Zymosan, est altérée dans les macrophages des souris *Tlr2^{-/-}* et *Myd88^{-/-}* [336,382].

En plus de Syk, l'intégration du signal Dectin-1/TLR aboutit également à l'activation de Raf-1 [331]. La coopération Dectin-1/TLR2 a été identifiée à différentes étapes de la réponse, lors de la phagocytose, de l'activation ERK1/2-MAPK, de la sécrétion de cytokines inflammatoires par les macrophages activés avec des mycobactéries [383,384]. Les BMDM stimulés par le Zymosan ou par *Mycobacterium abscessus* montrent que Dectin-1 interagit physiquement avec TLR2.

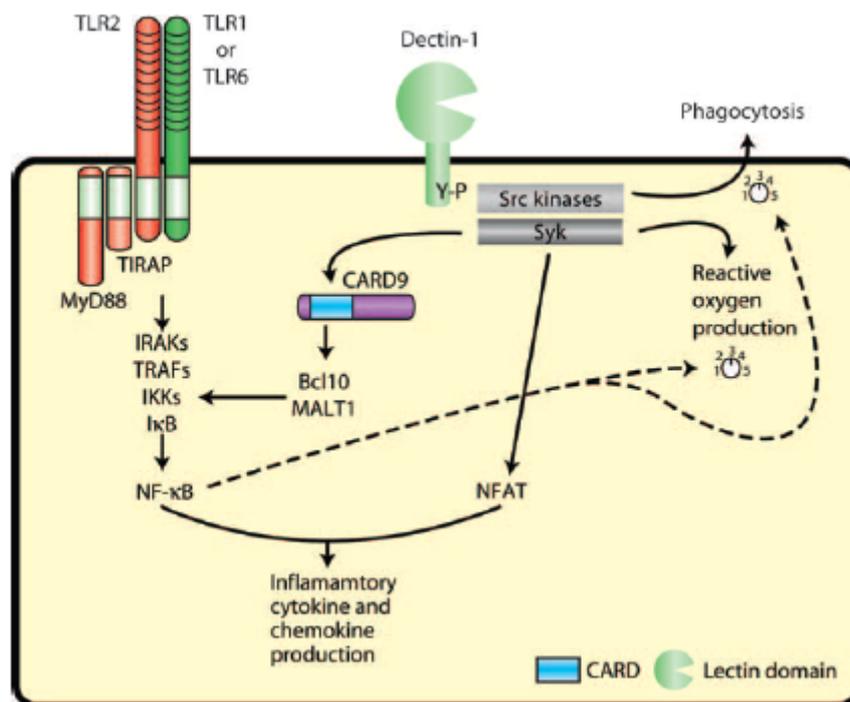


Figure I-37: La collaboration entre Dectin-1 et les TLRs [61].

I.4.3.2 Coopération entre Dectin-1 et les autres PRRs

En plus des TLRs, Dectin-1 peut aussi coopérer avec d'autres PRRs tels que les CLR et d'autres Lectines induits par la présence de mannanes dans les préparations de paroi de levure ou de champignon. Par exemple, dans les DC humaines, la co-stimulation de Dectin-1 et de DC-SIGN active le métabolisme de l'acide arachidonique [385]. Son homologue murin, SIGNR1 coopère également avec Dectin-1 pour la reconnaissance des espèces fongiques et du Zymosan non opsonisés [370] ainsi que pour l'explosion respiratoire en réponse à *C. albicans* [386]. SIGNR1 peut participer à l'augmentation de la production de TNF α dépendante de TLR2 induite par le Zymosan et *C. albicans* [387].

Dectin-1 et Galectin-3 agissent en collaboration lors de la reconnaissance des BG et des $\beta(1,2)$ -mannosides présents spécifiquement dans la paroi de *C. albicans*, respectivement. Ces deux protéines s'associent physiquement pour amplifier la production de TNF α dans les macrophages en réponse à la levure pathogène [388] (Figure I-38). En effet, les macrophages dans lesquels galectin-3 est sous exprimé produisent quatre fois moins de TNF α en réponse à *C. albicans* que les macrophages non manipulés.

Galectin-3 contribue à la distinction de la levure non pathogène *Sc* puisque cette même étude a montré que la production de TNF α n'était pas altérée dans le système précédent en réponse à *Sc*. De plus, Galectin-3 peut également s'associer à TLR2 et jouer un rôle similaire dans la discrimination des agents pathogènes [214].

Une étude récente a permis de montrer la coopération de Dectin-1 avec MR lors de la reconnaissance non opsonique de Zymosan, d'*A. fumigatus* et de *C. albicans* [389] (Figure I-38). Dectin-1 induit l'hydrolyse rapide de MR grâce à son activité métalloprotéase et génère des protéines solubles de MR (MRs) capables de se lier aux N-linked mannanes et de recouvrir les particules issues des parois. Les implications biologiques de ce processus ne sont pas encore définies mais contribuent à la compréhension des mécanismes d'adaptation de l'hôte.

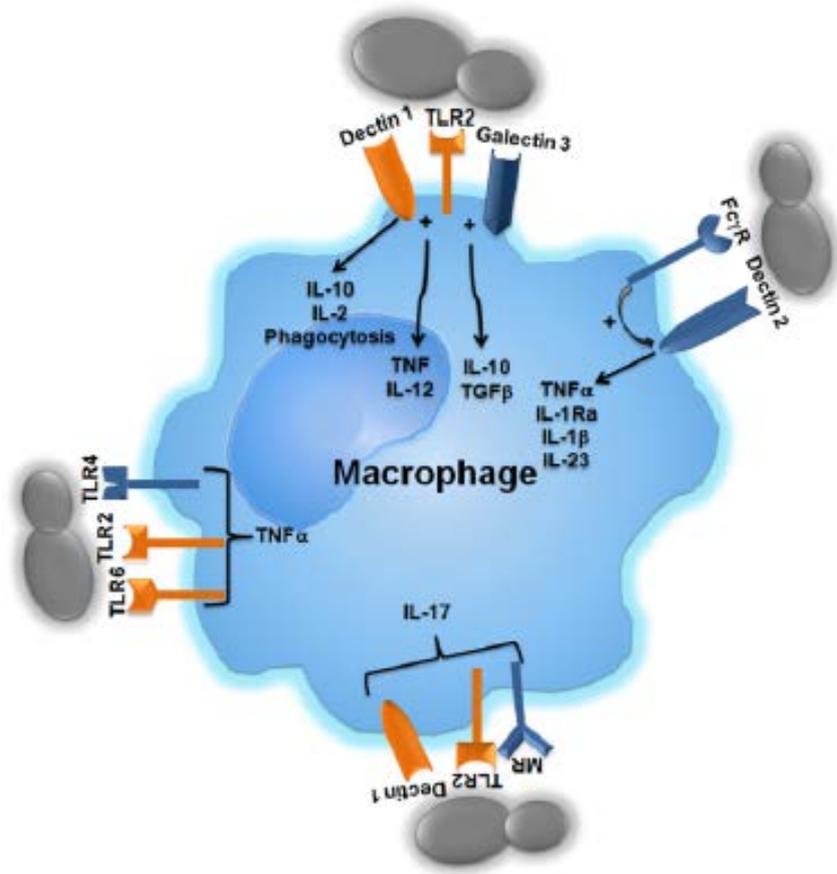


Figure I-38: La coopération des PRRs lors de la reconnaissance de *C. albicans* par les APCs [177].

I.4.3.3 Coopération entre Dectin-1 et certaines protéines transmembranaires

Dectin-1 est également capable de s'associer à des protéines transmembranaires, notamment avec la tétraspanine ubiquitaire CD63, tout comme la tétraspanine CD37 spécifique des cellules immunitaires [390,391]. Ces interactions contribuent à la stabilisation du récepteur Dectin-1 sur la membrane plasmique et sont aussi impliquées dans la régulation de la production d'IL-6 médiée par Dectin-1, ainsi que dans la phagocytose. L'existence de ces interactions semble rendre possible la formation d'un complexe macromoléculaire de signalisation ou « cluster de signalisation » composé des tétraspanines et éventuellement d'autres récepteurs PRRs [82].

En fonction des espèces de champignons, le macrophage formerait un cluster comprenant une combinaison unique de récepteurs afin d'optimiser la détection de l'agent pathogène et de créer une synergie adéquate parmi les PRRs [392]. Cependant, les mécanismes d'action restent à déterminer notamment concernant le recrutement des PRRs au sein de la membrane via des réarrangements lipidiques, et les voies de transduction conduisant à la synergie.

I.4.4 Les stratégies d'échappement à l'immunité

Certains champignons ont la capacité de modifier la composition de leur paroi pour échapper à la veille des cellules immunitaires innées. La plupart des champignons présentant un intérêt médicinal sont des agents opportunistes qui s'attaquent à l'hôte lorsque celui-ci est immuno-compromis. Comme nous l'avons précédemment mentionné, les BG sont les principaux composants de la paroi des levures et champignons sont majoritairement reconnus par Dectin-1 qui induit une réponse immunitaire antifongique. Une des stratégies déployées par les agents pathogènes pour échapper à ce processus consiste à masquer les BG des parois par des couches périphériques riches en mannanes chez la levure pathogène *C. albicans* [266,393]. Les mutants déficients en O- et N-linked mannanes sont d'ailleurs plus facilement phagocytés par les macrophages [394]. *Histoplasma capsulatum* dissimule les BG sous des couches riches en $\alpha(1,3)$ -glucanes [184] alors qu'ils se trouvent recouverts de substances hydrophobes chez les conidies d'*A. fumigatus* [395]. Notamment, l'hydrophobine RodA, qui masque les immunogènes déterminants de ses spores, altère l'activation et la maturation des DC et des macrophages alvéolaires.

Cryptococcus neoformans produit également des capsules extracellulaires de polysaccharides (GXM pour glucuronoxylomannanes et GalXM pour galactonoxylomannanes) qui recouvrent la paroi et préviennent la reconnaissance et l'internalisation de l'agent pathogène, et qui sont par conséquent intimement associées à sa virulence et sa pathogénicité [396]. En effet, en absence d'opsonisation, *C. neoformans* encapsulé n'est pas phagocyté. Il existe donc un intérêt croissant à développer de nouvelles approches thérapeutiques visant à démasquer les PAMPs de la paroi (BG), notamment par l'utilisation de caspofungine qui favorise la reconnaissance et la clairance des champignons pathogènes [397,398].

Par ailleurs, la morphologie est un déterminant majeur de la détection des composants de la paroi par les cellules de l'hôte. L'exposition des BG à la surface du pathogène peut varier avec le morphotype et par conséquent différentes formes du même champignon peuvent induire des réponses considérablement différentes. La capacité à changer de morphologie est une stratégie clé de la virulence qui permet à *C. albicans* d'échapper à l'immunité de l'hôte [399]. En effet, les mutants qui ne sont pas en mesure de changer de la forme bourgeonnante à la forme filamenteuse perdent leur virulence. De façon cohérente, il a été montré que la forme bourgeonnante de *Candida* induit une réponse Dectin-1-dépendante alors que la forme filamenteuse en est inapte [266,336]. Une étude a mis en évidence que la liaison Dectin-1/BG n'est possible qu'à certains emplacements à la surface de la levure bourgeonnante [266].

Ils correspondent aux bourgeons cicatriciels, zones d'altération de la structure pariétale résultant de la séparation des cellules filles de cellules mères lors de la croissance (Figure I-39A : Budding Yeast). En absence de mannanes, les BG y sont facilement accessibles. Au contraire, sous la forme filamenteuse les cellules poursuivent leur croissance mais les cellules filles ne se séparent pas des cellules mères (Figure I-39A : Filamentous Growth). De même, la détection des BG d'*A. fumigatus* dépend du morphotype [393,400] (Figure I-39B). Dans la nature, *Aspergillus* survit sous forme de conidies. Une fois inhalées, si elles ne sont pas éliminées, elles germent et forment des tubes qui s'étendent en hyphes filamenteux. La détection des BG par Dectin-1 et l'induction d'une réponse (recrutement des neutrophiles dans les voies aériennes et production de cytokines par les macrophages alvéolaires en modèle infectieux murin) a été observée pour toutes les formes sauf pour les conidies [400]. A la différence de *C. albicans*, les BG d'*A. fumigatus* sont exposés à la surface des tubes de germination et des hyphes et sont ainsi accessibles à Dectin-1.

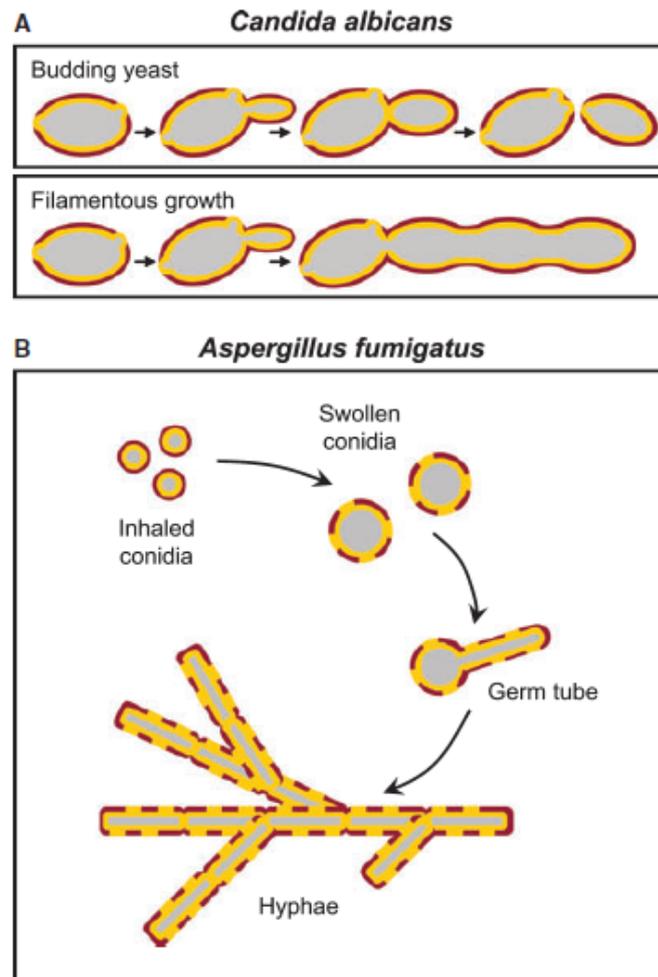


Figure I-39: La morphologie des champignons et son influence sur la capacité de Dectin-1 à reconnaître les BG [309].

Les champignons utilisent également d'autres mécanismes tels que la modulation du système du complément ou le ciblage de récepteurs permissifs pour échapper à la reconnaissance de l'hôte. *Aspergillus* et *Candida* peuvent empêcher l'opsonisation par le complément en recrutant des protéines régulatrices à leur surface (Facteur H, protéine C4) ou en sécrétant des protéases qui dégradent le complément ou des facteurs inhibiteurs [401]. D'autres champignons tels que *Blastomyces dermatitidis* ciblent des récepteurs plus permissifs du phagocyte (CR3) pour éviter le déclenchement des mécanismes effecteurs antifongiques et la production de cytokines inflammatoires [402]. Finalement, plusieurs espèces fongiques pathogènes (*Cryptococcus*, *Candida*, *Aspergillus*) intègrent des compartiments spécifiques (endothéliums et épithéliums) pour échapper à la détection des phagocytes [403]. Comme nous l'avons précédemment abordé, certains agents pathogènes (*C. neoformans*, *C. albicans* et d'*A. fumigatus*) sont capables d'éviter au processus antimicrobien lors des étapes de maturation du phagosome (inhibition de la maturation, évasion du phagosome, résistance aux conditions dégradantes du phagosome) [358,393].

Chapitre II : Résultats des travaux de recherche

Article 1

**Triggering Dectin-1 pathway alone is not
sufficient to induce cytokine production by
murine macrophages**

Publié dans PLoS ONE

II.1 Analyse des effets des BG sur les macrophages murins *in vitro*

II.1.1 Contexte et objectifs

Les β -glucanes (BG) sont les polyosides les plus abondants de la paroi de levure et notamment de *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*). Depuis très longtemps, ces composés sont universellement reconnus par la médecine traditionnelle et ancestrale pour leurs propriétés immunostimulantes. De nombreuses sources de BG, notamment des champignons comme les basidiomycètes, sont consommés en Chine et au Japon, car ils sont censés avoir un effet favorable sur la santé. Les bénéfices sur l'immunité, voire même leur potentiel thérapeutique ont contribué de façon significative à les rendre populaires dans les sociétés occidentales. Les travaux de Pillemer et Ecker publiés en 1941 sont précurseurs en matière de connaissance de ces produits [190]. Ils décrivent une préparation grossière de paroi de levure, plus tard dénommée Zymosan, capable de moduler l'immunité non spécifique et notamment le système du complément. Aujourd'hui, les BG entrent dans le traitement de certains cancers au Japon, notamment le Lentinan extrait du shiitake qui augmente de façon significative le taux de survie des patients atteints de cancers colorectaux ou gastriques à la phase terminale de la maladie [7,404]. En parallèle, de nombreux compléments alimentaires à base de BG font leur apparition sur le marché de la nutraceutique en raison de leurs divers bénéfices sur la santé, dont leurs effets anti-tumeurs, antibactériens, antifongiques et immuno-modulateurs [183,342].

Les BG, et notamment ceux purifiés à partir de *Saccharomyces cerevisiae*, sont des polymères de glucose dont la structure principale est composée d'une chaîne linéaire de molécules de D-glucose liées en $\beta(1,3)$, ramifiée en $\beta(1,6)$ par des chaînes de différentes tailles, localisées à différents intervalles le long de cette chaîne carbonée. La paroi de levure présente une organisation en couches, les BG se situant à l'interface des chitines ancrées à proximité de la membrane plasmique de la levure et des mannanes entremêlés aux glycoprotéines formant la barrière périphérique de la paroi [197]. Bien que provenant principalement des levures et des champignons, les BG sont également présents dans les céréales (orge, avoine), les algues et les bactéries.

La grande diversité de sources de BG, avec des structures, des conformations et même des propriétés physico-chimiques, selon qu'ils sont solubles ou particuliers, variables peut être à

l'origine d'une activité biologique très hétérogène, et donc influencer différemment la réponse des cellules immunitaires dont celle des macrophages [311]. En effet, la composition des parois varie entre les espèces et au sein d'une même espèce, de même que la longueur et le type de liaison de la chaîne carbonée [173,182]. A titre d'exemple, notons que les BG issus des plantes ont une structure primaire liée en $\beta(1,4)$ [342]. Cette large diversité moléculaire pourrait expliquer les résultats contradictoires obtenus à travers les différentes études menées sur les BG dans des modèles animaux et chez l'homme [181]. D'autre part, les préparations contenant les BG utilisées dans les différentes études publiées sont rarement caractérisées, et leurs compositions peu connues, conduisant les auteurs à attribuer de façon inappropriée certaines propriétés aux β -glucanes, et donc à extrapoler de façon erronée les effets d'une préparation à l'ensemble des BG et inversement. C'est pourquoi, il est indispensable de caractériser les extraits utilisés de manière à déterminer leur composition en BG.

De plus, Dectin-1, le récepteur majeur des BG, exprimé à la surface des cellules de l'immunité innée (macrophages, cellules dendritiques et neutrophiles) [297,318,380] est capable de s'associer et de collaborer avec d'autres récepteurs PRRs impliqués dans la reconnaissance des autres composants de la paroi des levures, qui provoquent l'activation des cellules immunitaires [84]. De nombreuses études sont basées sur l'utilisation de Zymosan, un extrait de paroi de *Sc*, considéré alors comme le BG prototypique par excellence malgré un contenu riche en PAMPs. En effet, son contenu en BG excède rarement 50% [2,191], rendant la composition du Zymosan similaire à celle d'une paroi brute de levure [170,174]. Récemment, Goodridge et al ont montré que les particules de Zymosan étaient capables d'induire une forte activation des macrophages suite à la liaison du récepteur Dectin-1, notamment via l'activation du facteur de transcription NF κ B et la production consécutive de cytokines inflammatoires de type TNF α , de même que la collaboration entre Dectin-1 et les récepteurs de type TLRs [327,329]. De plus, les mécanismes d'interaction BG/Dectin-1 demeurent encore mal connus à ce jour.

L'objectif principal de notre étude est la caractérisation de la réponse immunitaire induite par les BG extraits de *Sc* sur des macrophages murins et de déterminer dans quelle mesure Dectin-1 contribue à cette réponse. Afin de définir précisément la contribution des BG dans la réponse cellulaire, différentes préparations provenant de la même souche de *Sc* et avec un enrichissement croissant en BG (15, 65 et 75%) ont été évaluées sur des macrophages issus de souris C57Bl/6, exprimant ou non le récepteur Dectin-1.

Par ailleurs, des préparations dites de référence ont été incluses dans les expérimentations afin de comparer les composés à ceux couramment utilisés dans ce domaine, tels que le Zymosan, le Curdlan (purifié à partir d'*Alcaligenes faecalis*, les WGP particulaire et soluble (WGPd et WGPp) provenant de *Sc* et dont la teneur en BG est proche de 75%. Pour évaluer la réponse des différents types de macrophages et évaluer si les résultats obtenus peuvent être généralisés entre les différents types, des macrophages issus de la différenciation de progéniteurs myéloïdes de la moelle osseuse (BMDM ou Bone Marrow-Derived), et les macrophages isolés de la cavité péritonéale après injection de thioglycollate (TEPM ou Thioglycollate-Elicited Peritoneal Macrophages) ont été utilisés. Nous avons décrit les effets propres des BG sur les cellules, notamment en quantifiant les principales cytokines inflammatoires dans différentes conditions de stimulation (dose, durée d'incubation), la production de chimiokines pour le recrutement des neutrophiles ainsi que la mesure des aptitudes bactéricides des macrophages prétraités par les différentes préparations de BG.

II.1.2 Résumé

L'ensemble des analyses réalisées montrent que les extraits de paroi de *Sc* enrichis en BG (BG65 et BG75) ne sont pas capables d'induire une activité NFκB/AP-1 significative dans la lignée macrophagique rapporteur. Par ailleurs, nous avons constaté une faible production cytokinique à la suite de l'engagement de Dectin-1, et ce quelle que soit la dose ou la durée d'incubation. En revanche, les extraits dits bruts de paroi de levure, tels que le Zymosan ou le BG15 ou même le Curdlan, sont à l'origine d'une forte activation des macrophages notamment via l'augmentation de l'activité NFκB/AP-1, l'activation de la voie de signalisation MyD88 et la production de TNFα, directement corrélés à la capacité de ces molécules à activer TLR2 et TLR4. En effet, l'étude comparée de la réponse NFκB associée à la production de TNFα dans la lignée RAW-Blue, rapporteur de l'activité NFκB, a révélé que l'augmentation de la pureté des BG dans les extraits de *Sc* réduit très significativement la production de cytokines. D'autre part, le criblage des différents extraits à l'aide des lignées surexprimant HEK-hTLR2, HEK-hTLR4 et HEK-hDectin-1 après transfection montre que le processus d'enrichissement élimine la grande majorité des ligands des TLRs tout en maintenant l'activité sur Dectin-1 ; celle-ci est bien corrélée au degré d'enrichissement des extraits de levure en BG.

De plus, la déficience en MyD88 dans les BMDM immortalisés abolit de manière significative la production de TNF α en réponse aux extraits bruts (Zymosan, BG15) et au LPS utilisé comme contrôle positif alors qu'elle est identique avec les BG enrichis (BG65 ou BG75). Ceci confirme donc que la voie de signalisation passant par MyD88 à l'origine de la production de TNF α par les macrophages stimulés par BG15 ou le Zymosan est impliquée dans cette réponse. Nos résultats montrent donc que les BG enrichis sont de faibles activateurs de la réponse cytokinique des macrophages.

Ces hypothèses formulées à partir des données issues de la stimulation de lignées cellulaires, ont été confirmées à l'aide de cellules primaires comme les BMDM ou les macrophages péritonéaux. Une caractérisation des effets dose et temps des extraits a montré que quels que soient le temps d'incubation et les concentrations testés, BG65, BG75 ou WGPd induisent une réponse cellulaire largement inférieure à celle induite par BG15, Zymosan ou Curdlan, qui est grande, précoce et persistante. Par ailleurs, l'expression du récepteur Dectin-1 a été évaluée sur les différents types cellulaires et notamment sur les macrophages résidents (RPM) ou recrutés après injection de thioglycollate (TEPM) dans la cavité péritonéale. Les RPM, les TEPM au même titre que les BMDM issus des souris C57Bl/6 WT expriment des niveaux élevés de Dectin-1 et similaires à celui de la lignée de macrophages RAW, en comparaison de leurs homologues déficients en Dectin-1 utilisés comme contrôles négatifs. De plus, la faible production de TNF α par les RPM, les TEPM et les BMDM traités avec les extraits enrichis BG65 et BG75, confirme les observations précédentes et écartent la variabilité d'expression de Dectin-1 à la surface cellulaire comme facteur explicatif des différences entre types distinctifs de macrophages.

La caractérisation plus approfondie de l'expression et de la sécrétion des différentes cytokines de l'inflammation a été menée sur les BMDM de souris sauvages ou invalidées pour Dectin-1 ayant été en contact avec du BG15, BG65, BG75 ou du Zymosan. Comme attendu, BG15 et Zymosan ont induit une forte et précoce augmentation de l'expression des gènes pro- (*Il6*, *Il1b*, *Ccl2*, *Tnfa*) et anti-inflammatoires (*Il10*) dans les deux fonds génétiques contrairement aux deux extraits enrichis BG65 et BG75, qui engendrent une réponse très faible qui dépend de Dectin-1. D'autre part, la réponse initiée par les BMDM Dectin-1-déficients stimulés par les extraits bruts de paroi reste globalement inférieure à celle des BMDM l'exprimant, suggérant que Dectin-1 améliore la réponse inflammatoire des cellules prétraitées par les préparations de parois contenant des BG.

De façon surprenante, les BG enrichis stimulent l'expression forte et tardive de *Csf2* (codant le GM-CSF) via Dectin-1, alors que cette transcription est très faible dans les BMDM traités avec BG15 et Zymosan. Parallèlement, la sécrétion de ces cytokines et chimiokines a été évalué dans les surnageants des cultures de BMDM WT et Dectin-1-KO avec ces préparations de BG. Cette analyse confirme les résultats des profils d'expression des gènes et montrent que les extraits bruts induisent la production de toutes les cytokines précédemment examinées, contrairement aux extraits enrichis en BG. Ainsi, nous pouvons affirmer que les extraits enrichis en BG ne sont pas des activateurs de la production cytokinique dans les macrophages murins.

En lien avec ces résultats, nous avons par ailleurs montré que les surnageants provenant des cellules traitées avec les extraits bruts de paroi de *Sc* ont un potentiel chimio-attractant plus grand que ceux provenant de cellules traitées avec BG65 et BG75. En effet, les surnageants produits avec BG15 et Zymosan recrutent un nombre plus grand de neutrophiles que ceux obtenus avec BG65 et BG75, notamment par une augmentation significative de la concentration de chimiokines telles que CXCL1 (KC) et CXCL2 (MIP2). Notons que le faible recrutement des neutrophiles induit par les BG enrichis requiert Dectin-1, contrairement à celui provoqué par les extraits bruts. Ceci suggère donc que les deux catégories de préparations, brutes ou enrichies en BG sollicitent des voies de signalisation différentes. Ces données obtenues à l'aide d'essais *in vitro* ont été confirmées par l'analyse *in vivo* du recrutement cellulaire après injection intra-péritonéale des extraits chez la souris. Pour le Zymosan et BG15, le recrutement cellulaire était largement dominé par les neutrophiles, ce qui témoigne de l'intensité de la réponse inflammatoire sous-jacente produite par les extraits bruts.

Enfin, la caractérisation des effets propres des BG enrichis sur les macrophages a été complétée par un essai visant à décrire les capacités bactéricides des macrophages prétraités avec les différentes préparations de parois de *Sc*. Tout d'abord, la détermination de la production de radicaux libres oxygénés (ROS) a montré que les BG enrichis BG65 et BG75 promeuvent une production de ROS nettement supérieure à celle des extraits bruts par les BMDM dans les 30 min suivant la stimulation. De façon surprenante, la production de ROS induite par les BG enrichis est indépendante de Dectin-1- mais dépend de CR3, alors que celle induite par les extraits bruts, bien que très faible, se révèle dépendante des deux voies de signalisation.

En lien avec ces résultats, le prétraitement des BMDM avec les extraits enrichis en BG n'augmente significativement pas leur capacité de phagocytose de l'agent bactérien *S. aureus* HG001, mais semble améliorer les capacités bactéricides des macrophages en comparaison des extraits bruts de *Sc* CW.

Cette étude montre donc que contrairement à l'idée communément répandue, les BG ne sont pas capables d'induire une réponse cytokinique significative dans les macrophages et donc que la voie de signalisation en aval de Dectin-1 ne conduit pas à l'établissement d'une réponse inflammatoire de forte intensité dans les macrophages murins. En revanche, le traitement des macrophages par les BG enrichis est à l'origine de l'augmentation de l'expression tardive de *Csf2* et d'une amélioration des capacités bactéricides de la cellule (production de ROS et bactéricidie après phagocytose).

II.1.3 Article 1

RESEARCH ARTICLE

Triggering Dectin-1-Pathway Alone Is Not Sufficient to Induce Cytokine Production by Murine Macrophages

Sarah Walachowski^{1,2}, Guillaume Tabouret^{1,2}, Gilles Foucras^{1,2}*

1 Université de Toulouse, INP-ENVT, UMR 1225, IHAP, Toulouse, France, **2** INRA, UMR1225, IHAP, Toulouse, France

☞ These authors contributed equally to this work.

* g.foucras@envt.fr



CrossMark
click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Walachowski S, Tabouret G, Foucras G (2016) Triggering Dectin-1-Pathway Alone Is Not Sufficient to Induce Cytokine Production by Murine Macrophages. PLoS ONE 11(2): e0148464. doi:10.1371/journal.pone.0148464

Editor: Roland Lang, Friedrich-Alexander-University Erlangen, GERMANY

Received: September 20, 2015

Accepted: January 17, 2016

Published: February 3, 2016

Copyright: © 2016 Walachowski et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was partly financed by Phileo-Lesaffre Animal Care. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. Other sources of funding were from Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) and Institut National Polytechnique - Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse (INP-ENVT).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

β -glucans (BG) are abundant polysaccharides of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall (Sc CW), an industry byproduct. They have immuno-stimulatory properties upon engagement of dectin-1 (*Clec7a*), their main receptor on particular immune cells, and they actually become of great interest because of their preventive or therapeutic potentials. Zymosan, a crude extract of Sc CW was studied as a prototypic BG, despite its miscellaneous PAMPs content. Here, we examined the response of murine wild type or *Clec7a*^{-/-} bone marrow-derived macrophages (BMDM) to products with increasing BG content (15, 65 or 75%) and compared their effects with those of other dectin-1 ligands. The enrichment process removed TLR ligands while preserving dectin-1 activity. The most enriched extracts have very low NF κ B activity and triggered low amounts of cytokine production in contrast with crude products like zymosan and BG15. Furthermore, *MyD88*^{-/-} BMDM did not produce TNF α in response to crude Sc CW extracts, whereas their response to BG-enriched extracts was unaffected, suggesting that BG alone are not able to initiate cytokine secretion. Although Sc CW-derived BG stimulated the late and strong expression of *Csf2* in a dectin-1-dependent manner, they remain poor inducers of chemokine and cytokine production in murine macrophages.

Introduction

For centuries, fungal cell wall components have been commonly used in traditional Oriental medicine [1], and their benefits are mainly attributed to β -glucans (BG). These polysaccharides have recently become of interest in Western countries, because of their activity on innate immune cells and their potential therapeutic applications. Indeed, BG have various valuable properties including antitumor [2], antidiabetic, and anti-microbial activity against viral, bacterial and fungal diseases (reviewed by *Chen et al* [3]). Strikingly, *Lentinan* has been shown to improve the survival rate of Japanese patients with gastric and colorectal cancers [4]. Given the various potential health benefits attributed to BG, many dietary supplements containing BG

are available. BG are the most abundant polysaccharides of the fungal cell wall. They are intermingled with chitins (polymers of N-acetylglucosamine) that are located near the plasma membrane, and mannans that are anchored to the outer cell wall, all of which are interspersed with glycoproteins [5]. β -glucans are polymers of glucose and have a backbone of linear $\beta(1,3)$ -linked D-glucose molecules with $\beta(1,6)$ -linked side chains of diverse sizes occurring at different intervals along the backbone. Although BG can be extracted from mushrooms, oat, barley, seaweed, algae, bacteria and yeast, the composition of the cell wall varies greatly within and between species and the length and types of linkage also differ [6,7]. This heterogeneity of structure, conformation, source and even nature (soluble or particulate) among BG influences the biological response of immune cells. This may explain conflicting findings regarding the effects of BG in human or animal models. Moreover, the effects of one preparation of ' β -glucans' are often inappropriately extrapolated to all β -glucans, and ' β -glucans' need to be characterized to better define the type of immune response that they elicit. Indeed, the total BG-content of extracts used for investigation is rarely determined. Despite the complexity of BG, several molecules [8,9] including complement receptor 3 (CR3), lactosylceramide (LacCer), scavenger receptor (SRs) and dectin-1 [10,11], recognize BG on the cell surface of macrophages, monocytes, dendritic cells, NK cells and neutrophils [12].

So far, most studies designed to investigate the activities of BG have used zymosan [13], which is considered as a source of BG. However, the BG content of zymosan rarely exceeds 50% [2,14], which is similar to the BG content of the *Sc* CW [15,16]. Other components are also present that are PAMPs for several other PRRs including TLRs on innate immune cells. Goodridge *et al* recently demonstrated that zymosan particles strongly stimulate macrophages to produce TNF α , as a result of dectin-1, which activates NF κ B [17,18]. Moreover, dectin-1 and TLR2 work together to enhance TLR2-mediated NF κ B signaling and the release of pro-inflammatory cytokines [19]. Nevertheless, it remains unclear how dectin-1 interacts with *Sc* BG compounds. The main challenging issue of this study was to determine whether dectin-1 is involved to the macrophage response triggered by a series of three increasingly BG-enriched CW extracted from the same strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Contrary to conventional BG wisdom, we found that *Sc* CW extracts highly-enriched in BG do not elicit NF κ B activity and that dectin-1-dependent-cytokine production in response to these compounds is very much lower than that induced by crude compounds like zymosan. These unpurified products have the capacity to induce TLR2 and TLR4 activities resulting in strong signaling via MyD88 and NF κ B. Therefore, our data show that the robust response elicited by zymosan is not strictly caused by its BG content. Altogether our findings demonstrate that BG are poor inducers of cytokine production in murine macrophages.

Materials and Methods

Reagents

RPMI 1640 GlutaMAX™, DMEM GlutaMAX™, PBS, Non-Essential Amino Acids (NEAA), sodium pyruvate and antibiotics for cell culture such as Penicillin-Streptomycin (Pen-Strep™), Gentamicin™, Normocin™ and Zeocin™ were purchased from GIBCO (Life Technologies). Fetal Bovine Serum (FBS) was provided by Eurobio, France. The dectin-1 and TLR ligands used as controls were from InvivoGen. The following compounds were compared with *Sc* BG compounds as described below: zymosan (zym), particulate (WGPd) and soluble glucan-enriched compound (WGPs) and curdlan (curd), a linear $\beta(1,3)$ -glucan extracted from *Alcaligenes faecalis*. The synthetic triacylated lipoprotein Pam3CSK4 and ultraPure lipopolysaccharide (LPS) from *E. coli* O111:B4 both purchased from InvivoGen (France).

Table 1. Main composition of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall compounds.

Constituents	Yeast Cell Wall Preparation		
	BG15	BG65	BG75
Dry matter (%)	94.3	95.8	94.0
Beta-glucans (%)	16.3	67.1	77.0
Glycogen (%)	9.4	13.0	0.0
Mannans (%)	18.9	3.7	0.7
Total glucans (%)	25.7	69.1	74.4
Proteins (%)	33.3	3.4	3.6

doi:10.1371/journal.pone.0148464.t001

BG compounds of interest were extracted from the same strain of *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) owned by Phileo-Lesaffre Animal Care. The crude extract originally contained a total BG content of 15% (BG15) and was further enriched using several methods to generate two compounds, BG65 and BG75, with a total BG content of 65% and 75%, respectively. The BG15 extraction method from *S. cerevisiae* was mainly the same as for zymosan preparation [20] and resulted in “ghost” cells with an average particle diameter of 3 μm deprived of nucleic acid [14]. BG65 was obtained from a suspension of BG15 (14%) by hot alkaline hydrolysis (4% NaOH, 90°C, 2 h) to remove mannoproteins and lipids. BG75, the most enriched *Sc* CW, was prepared from a suspension of BG65 (14%) which was submitted to an enzymatic hydrolysis (amylase and amyloglucosidase) to eliminate the contaminant glycogen. Both products were then lyophilized (dry matter > 94%). The BG content of each *Sc* CW preparation was determined using the enzymatic yeast beta-glucan kit (K-EBHLG, Megazyme, Ireland) and the total amount of glucose released was measured by HPLC. Dry powders were suspended in cell culture medium at 10 mg/mL and were then dispersed by pipetting 20 times up and down through a syringe fitted with a 26G needle to optimize bioavailability. Composition of BG extracts is presented in Table 1. According to the manufacturer, WGPd and curdlan used in this study contain more than 75% and 80% of BG, respectively. Concerning zymosan, the content in BG did not differ from a yeast cell wall and is comprised between 50 and 57% (percentage of dry matter) [14].

Culture of reporter cell lines

The NF κ B reporter cell lines HEK-Blue™-hTLR2, HEK-Blue™-hTLR4, HEK-Blue™-hTLR9 and HEK-Blue™-hDectin-1 (InvivoGen) which overexpress the human TLR2, TLR4, TLR9 or dectin-1 receptors and the Secreted Embryonic Alkaline Phosphatase (SEAP) reporter gene driven by an NF κ B-inducible promoter. A recombinant HEK293 cell line expressing the reporter gene only (HEK-Blue™-null) was used as a negative control.

RAW-Blue™ Cells (InvivoGen) are derived from murine RAW264.7 macrophages containing a chromosomal integration of an SEAP reporter construct driven by NF κ B and AP-1.

All cell lines were cultured and propagated according to the manufacturer's recommendations. Briefly, HEK-Blue™ and RAW-Blue™ cells were grown in medium containing high glucose DMEM GlutaMAX™ supplemented with 10% heat-inactivated FBS (30 min, 56°C), 100 U/mL Penicillin-Streptomycin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Normocin™ and appropriate selective antibiotics.

Measurement of TLR, dectin-1 and NF κ B activity using reporter cell lines

For HEK-Blue-hTLR and -hdectin1 assays, cells were plated in 96-well tissue culture plates at 1×10^5 cells/well in HEK-Blue™ Detection medium containing the substrate for SEAP. Serial dilutions of *Sc* BG and other sourced BG extracts were used for stimulation Supernatants were

transferred to a new plate and the optical density (OD 650 nm) was measured (VERSAmax plate reader, Molecular Devices).

To assess NF κ B activity, RAW-Blue™ macrophages were cultured in the recommended medium and incubated in the same conditions. SEAP was measured using a colorimetric enzymatic assay. Supernatants were incubated with Quanti-Blue™ (InvivoGen) 25% v/v. for 2 h at 37°C, and OD 650nm was measured.

Immortalized BMDM culture and functional assay

Murine wild type (WT) and *MyD88*^{-/-} immortalized BMDM (iBMDM) were generously provided by Dr. R. Volmer (IHAP, Toulouse), to examine the involvement of TLR pathways in the cellular response to *Sc* BG compounds (BG15, BG65 and BG75) and controls (zymosan and WGPd). These cells were subcultured in high glucose DMEM GlutaMAX™ supplemented with 10% heat-inactivated FBS (30 min, 56°C) and 100 U/mL Pen-Strep. Cells were plated in 96-well plates at 1x10⁵ iBMDM/well for 16 h until complete adherence before being stimulated with *Sc* BG compounds and controls. Supernatants were collected and stored at -20°C until further use.

Animals

WT C57Bl/6 and DBA/2 mice were purchased from Janvier Labs (St Berthevin, France) and *Clec7a*^{-/-} mice [11] were originally provided by Pr. Gordon Brown (University of Aberdeen, Scotland) and were bred in-house. Eight to 12-week old C57Bl/6 *Clec7a*^{-/-} mice and their strain-matched WT controls from both sexes, and female DBA/2 mice were housed under pathogen-free conditions in an accredited research animal facility of the National Veterinary College (UMR IHAP, Toulouse, France). This study was carried out in strict accordance with the Federation of European Laboratory Animal Science Association guidelines (FELASA). Experiments were performed by FELASA accredited investigators (n° 311155580) in strict accordance with the recommendations of the local ethics committee, 'Science et Santé Animale' (SSA). Mice were sacrificed by cervical dislocation and all efforts were made to minimize animal pain and distress.

Peritoneal cells collection and flow cytometry analysis

Inflammatory peritoneal macrophages were elicited by intra-peritoneal injection for 4 days of sterile 4% brewer thioglycollate medium (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich) prepared according to the manufacturer's recommendations. A model of peritonitis was used to evaluate the inflammatory response intensity induced by our BG compounds. Mice were challenged for 6 h with 100 μ g/mice of BG15, BG75 and zymosan. Total peritoneal cells including inflammatory monocytes, neutrophils and macrophages (resident peritoneal macrophages (RPM) or thioglycollate-elicited macrophages (TEPM)) were harvested from the peritoneal cavities of mice by lavage with cold PBS supplemented with 5mM EDTA and 0.2% heat-inactivated FBS. After collection, cells were centrifuged (300g, 5 minutes) and absolute cells and macrophages numbers were determined by flow cytometry (MACSQuant[®], Miltenyi Biotec, Germany). Cells were preincubated with anti-CD16/CD32 (Biolegend, Ozyme-France) to block Fc γ RII/III receptors and then incubated with the following fluorochrome conjugated mAbs: anti-CD115 (CSF-1R; Biolegend, Ozyme-France) and anti-dectin-1 (2A11; AbD serotec) or its isotype control IgG1 (A110-1, BD biosciences Pharmingen). Anti-Ly6G mAb (1A8, Biolegend) or combination of anti-F4-80 (CI:A3-1; AbD serotec) and anti-Ly6C (HK1.4, Biolegend) mAbs labeling were used to identify neutrophils and inflammatory monocytes, respectively. A 7-AAD staining (Biolegend, Ozyme-France) was used to discriminate death cells and doublets of cells were

excluded with a gating on FSC-H/FSC-A. The acquisition was performed on 1×10^5 cells using MACSQuantify software (Miltenyi Biotech, Germany). Data were analyzed with FlowJo software (FlowJo LLC, USA).

Primary cell culture and functional assays

Murine BMDM were obtained as described previously [21]. Briefly, myeloid cells precursors from bone marrow were matured for 7 days (37°C , 5% CO_2) in complete RPMI (containing RPMI GlutaMAX™ supplemented with 10%, heat-inactivated FBS, 1% sodium pyruvate, 1% NEAA, 100 U/mL Pen-Strep or 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ gentamicin) supplemented with 30% LADMAC (ATCC® CRL-2420™ [22,23]) cell-conditioned medium (LCM) as a source of M-CSF. After differentiation, the cell preparation contained a homogenous population of macrophages ($>96\%$ F4/80⁺).

BMDM and TEPM were plated in 96-well tissue culture plates at 1×10^5 cells/well for 16 h in complete RPMI at 37°C and 5% CO_2 until complete adherence. After culture of TEPM, non-adherent contaminating peritoneal cells were eliminated by repeating three gentle washing of wells with pre-warmed culture medium or PBS. After stimulation with Sc BG compounds or dectin-1 ligands controls, supernatants from both cell types were collected and stored at -20°C until further use.

Quantification of cytokines and chemokines by ELISA or multiplex EIA

Cytokines were quantified by a customized multiplex (Milliplex-MAP, Merck Millipore, France) assay kit and Luminex 100 IS instrument (Luminex, USA) at the Anexplo phenotyping service platform (CHU Rangueil, Toulouse, France). Thirteen cytokines were systematically assayed in BMDM: TNF α , IL-1 β , IL-10, IL-6, CXCL1 (KC), CXCL2 (MIP-2) and CCL2 (MCP-1). Individual cytokine detection kits were also used to quantify mouse TNF α , IL-6 and IL-1 β (Biolegend, Ozyme-France), and GM-CSF (R&D Systems, France).

RT qPCR gene expression analysis

Total RNA was purified with the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA was quantified with a NanoDrop® 1000 spectrophotometer and NanoDrop 1000.3.7 software and RNA quality was assessed using the Agilent RNA 6000 Nano Kit on BioAnalyzer and 2100 Expert Software (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) at the GeT-TRiX platform (INRA, Toulouse, France). Total RNA (300 ng) was reverse transcribed using the SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix Kit (Invitrogen) following the manufacturer's protocol. Quantitative PCR was performed with the Biomark HD System (Fluidigm, France) at the GeT-PlaGe genotyping service platform (INRA, Toulouse, France) according to the manufacturer's recommendations. Primer3plus software was used to design the primers (Table in S1 Table) and housekeeping genes were selected with GeNorm Software. The abundance of mRNA of interest was normalized to that of *Sdha*, *Rpl9* and *Hprt1* and relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method.

Detection of ROS by chemiluminescence

The production of ROS by primary cultured BMDM was measured by chemiluminescence upon stimulation. WT and *Clec7a*^{-/-} cells were handled as described above and seeded in 96-black chimney well culture plates in phenol red-free complete RPMI at 1×10^5 cells/well in triplicate for 16 h before the experiment. Luminol powder (Sigma-Aldrich) was suspended in DMSO and then diluted 1000-fold in cell culture medium according to the supplier's

recommendations. Immediately before ROS were measured, supernatant was removed and Luminol and BG products were added simultaneously to each well. The chemiluminescence of each well was continuously acquired for 2 h post-stimulation in a Tecan Infinite 200 microplate reader. To assess the contribution of CR3 to ROS production, WT cells were preincubated with anti-CD11b (α CD11b) mAb (M1/70) or a control rat IgG2b mAb (Biolegend, Ozyme-France) for 1 h and were then stimulated with BG compounds.

Isolation of bone marrow neutrophils and chemotaxis assay

Murine bone marrow neutrophils were freshly isolated from femurs and tibiae with Percoll. Red blood cells were lysed by ACK and BM cells were resuspended in a 62% v/v gradient of Percoll in HBSS-Prep (constituted by Ca-Mg-free HBSS supplemented with 0.5% heat-inactivated FBS) and centrifuged for 30 min at 1000g. The cloudy pellet of neutrophils was washed twice in HBSS-Prep. Purity and viability were estimated by flow cytometry and were found to be >90% and > 85%, respectively. Neutrophils (5×10^5 cells/well) were seeded in the upper chambers of a 96-well transwell plate with a 3- μ m pore size polycarbonate membrane (Corning, Lifescience, USA). The lower chamber contained supernatants collected from a culture of WT and *Clec7a*^{-/-} C57Bl/6 (and WT DBA/2 in [S4A Fig](#)) BMDM pretreated for 8 h with Sc BG compounds (100 μ g/mL). After a 30 min incubation in a cell culture incubator (37°C, 5% CO₂), the upper chambers were removed and the absolute number of migrated neutrophils was determined by flow cytometry using MACSQuant Analyzer.

Assessment of phagocytosis and bactericidal activity

GFP-expressing mutants of the *S. aureus* HG001 strain were prepared as described previously by *Accarias et al* [21]. To assess the phagocytosis and bactericidal activity of BMDM, cells were first stimulated 8 h with 100 μ g/mL of Sc CW compounds (BG15, BG65 and BG75) in 24-well plate (5×10^5 cells/well) as described below and then infected at an MOI = 10 with HG001-GFP bacteria for 1 h (37°C, 5% CO₂). The supernatant was removed and cells were washed twice with warm PBS. Warm complete RPMI supplemented with Gentamicin™ was then added for 4 or 16 h. At the end of the incubation, cells were lysed with 0.1% Triton X-100 PBS and intracellular bacteria were labeled with propidium iodide (PI) (ImmunoChemistry Technologies, USA) according to the manufacturer's instructions. Cell lysates were analyzed by flow cytometry (MACSQuant®, Miltenyi Biotech, Germany) and the amount of live and dead engulfed bacteria were determined using the GFP⁺PI⁻ and GFP⁺PI⁺ gates respectively (MACSQuantify™ Software). Data regarding phagocytosis and bactericidal activity are representative of two independent experiments (Data in [S4C Fig](#)).

Statistical analysis

All experiments were performed three times unless otherwise specified and data are expressed as the mean \pm SD of the values from all experiments. Each condition was performed in triplicate. Statistical significance was assessed using a two-tailed unpaired *Student's t-test* with a threshold set at $p < 0.05$. Mean values shown with different letters on plots are significantly different.

Results

NF κ B activity in murine macrophages varies according to the degree of BG enrichment

We used RAW macrophage reporter cell line to examine the effect of two BG-enriched Sc CW extracts as compared to other BG sources on the NF κ B pathway ([Table 1](#)). At a concentration

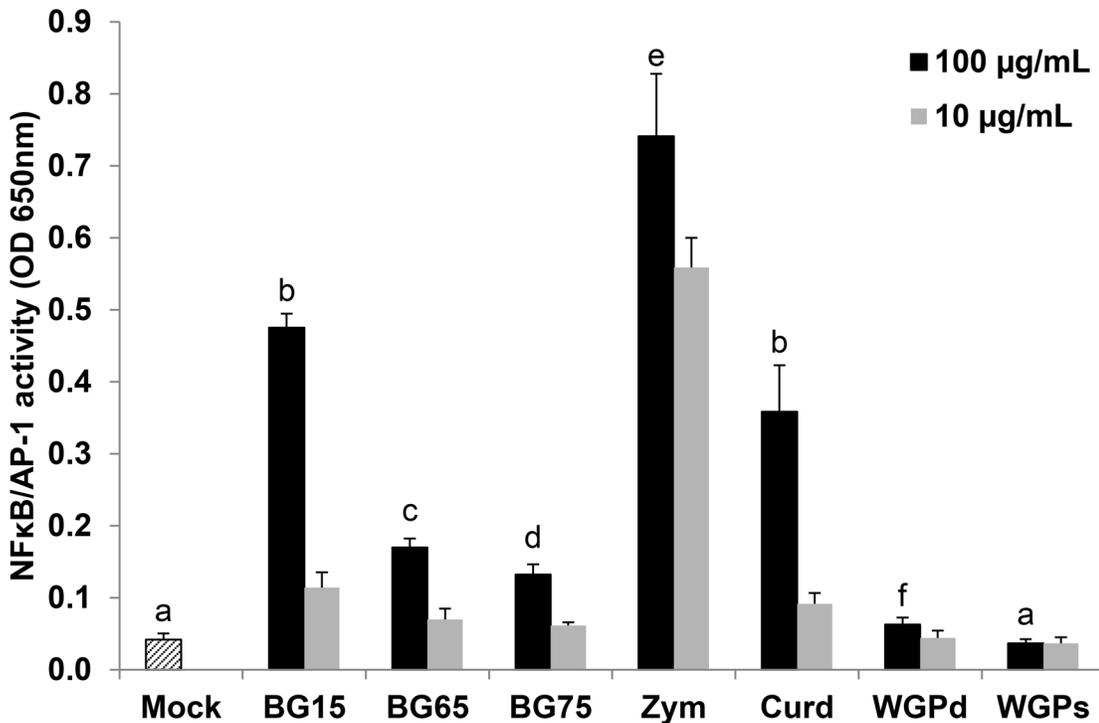


Fig 1. *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) extracts enriched in β -glucan (BG) are much weaker inducers of NF κ B/AP-1 activity in RAW-Blue™ macrophages than other sources of BG. NF κ B/AP-1 activity was determined by a colorimetric enzyme assay using RAW-Blue™ macrophages as reporter cell line. Cells were treated for 16 h with 100 or 10 μ g/mL of various Sc BG extracts (BG15, BG65 and BG75) or with zymosan, curdlan, dispersible WGPd and soluble WGPd as controls. Data are expressed as the mean OD 650nm \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the Student's *t*-test ($p < 0.05$). Comparisons are shown for BG compounds used at 100 μ g/mL.

doi:10.1371/journal.pone.0148464.g001

of 100 μ g/mL, Sc compounds enriched in BG (BG65 and BG75) were very much weaker inducers of NF κ B/AP-1 activity than crude extract (BG15) or zymosan (Fig 1). Similarly, NF κ B/AP-1 activity was low in RAW macrophages stimulated with a commercial source of purified $\beta(1-3)(1-6)$ -glucan, WGPd as a control which confirms that at least two different sources of enriched BG are poor inducers of NF κ B/AP-1 activity. Furthermore, soluble WGP from *Saccharomyces cerevisiae* failed to activate NF κ B/AP-1 in these cells. Conversely, curdlan, the linear $\beta(1,3)$ -glucan extracted from *Alcaligenes faecalis*, strongly activated NF κ B/AP-1. Interestingly, in cells treated with a lower concentration of compounds (10 μ g/mL), only zymosan and not BG15 and curdlan, was able to activate NF κ B/AP-1, indicating that zymosan was more potent to stimulate NF κ B and AP-1 pathway.

To confirm that highly-enriched BG do not activate NF κ B/AP-1, we tested a large range of concentrations in reporter cells and found that higher concentrations of the enriched compounds BG65 and BG75 did not either stimulate NF κ B/AP-1 activity (Data in S1 Fig), whereas, BG15 and zymosan induced NF κ B/AP-1 activity to the same extent as 100 ng/mL of ultraPure LPS. Taken together, these data strongly suggest that BG alone cannot consistently activate NF κ B/AP-1.

Sc CW extracts enriched in BG activate dectin-1 but not TLR2/4

Given that particulate BG-enriched Sc CW, but not crude extracts of Sc CW, failed to induce substantial NF κ B/AP-1 activity, we next investigated whether these extracts stimulated the two main TLRs, using TLR2 and TLR4 reporter cell lines. Consistent with previous data, Sc crude

extracts like zymosan and BG15, but also curdlan, activated TLR2 to a similar extent as 100 ng/mL of Pam3CSK4, a synthetic ligand of the TLR2 receptor (Fig 2A). Conversely, the BG-enriched extracts BG65 and BG75 as well as WGPd did not activate TLR2, suggesting that $\beta(1-3)$ -glucans but not $\beta(1-6)(1-3)$ -glucans interact with TLR2.

Similarly, the stimulation of HEK-Blue™-TLR4 cells with zymosan, curdlan, and to a lesser extent BG15, induced TLR4 signaling to a similar extent as 100 ng/mL of the positive control, ultraPure LPS; however, this was not true for highly-enriched BG compounds (BG65, BG75 and WGPd) (Fig 2B). Using similar assay with HEK-hTLR9 reporter cells, we completely rule out the presence of remaining DNA from yeast cells in crude BG15, zymosan, curdlan and enriched-BG compounds (S2 Fig). We next evaluated the ability of each compound to stimulate dectin-1 activity using the same approach. At the assayed concentrations (1–100 μ g/mL), dectin-1 was activated by BG65, BG75 and to a lesser extent by BG15 and zymosan particles in a dose-dependent manner (Fig 2C). Conversely, dectin-1 activity was much lower in curdlan and WGPd, and soluble WGP did not activate dectin-1 at all. Strikingly, concentrations higher than 100 μ g/mL for BG65 and BG75 provided saturated signals (data not shown). These data indicate that the purification process was efficient at removing the TLR2/4 activities and dectin-1 activity is correlated with the degree of BG enrichment.

TNF α production in Sc CW products treated-macrophages correlates with their reported NF κ B activity

Our results suggest that NF κ B/AP-1 activation in macrophages treated by Sc crude extracts or curdlan is directly related to the ability of these molecules to stimulate TLR2/4; therefore, we examined whether RAW-Blue™ macrophages also produce the NF κ B-associated pro-inflammatory cytokine, TNF α . Consistent with the data presented above (Fig 1), TNF α production was highly correlated with NF κ B activity. Indeed, only a small amount of TNF α (less than 1 ng/mL) was detected in the supernatant of cells treated with the highly-enriched Sc CW extracts, BG65, BG75 and WGPd, whereas at 100 μ g/mL, BG15, zymosan and curdlan stimulate the production of more than 6 ng/mL of TNF α (Fig 3A). The 10-fold dilution of BG15, curdlan and to a lesser extent, zymosan, significantly diminished the cytokine production.

After having assessed the biological effects of Sc BG compounds on the RAW cell line, we next focused on primary murine macrophages (BMDM). We first performed a time-course assay to determine the optimal duration of exposure to BG compounds. BMDM produced lower amounts of TNF α than RAW-Blue™ cells, but the response to BG compounds was highly correlated between the two cellular models (Fig 3B). Moreover, this experiment confirmed that regardless of the incubation time, macrophages incubated with highly-enriched Sc BG compounds or WGP produce much lower amounts of TNF α than those stimulated with BG15, zymosan or curdlan (Fig 3B). Thus, cells incubated for a longer time with enriched compounds do not produce more cytokine. For all compounds, TNF α production began at 4 h and generally increased with time at a rate depending on the BG source. Zymosan triggered a strong, early and long-lasting response in macrophages which was higher than that of all other BG extracts tested. Indeed, the release of TNF α in response to Sc CW extracts enriched in BG peaked at 8–16 h of incubation and remained low until the end of the time course experiment, in contrast to crude Sc CW extracts (Fig 3B). Therefore, 8 h is the incubation time that leads to maximal cytokine production in response to Sc CW extracts. We then examined how the concentration of Sc BG influences TNF α production in BMDM (Fig 3C). At each concentration tested, more TNF α was released in response to BG15 than either BG65 or BG75 (from 2-fold higher at 1000 μ g/mL to 15-fold higher at 100 μ g/mL). Surprisingly, at high concentrations (300 and 1000 μ g/mL), BG75 was more potent to induce TNF α production than BG65 whereas

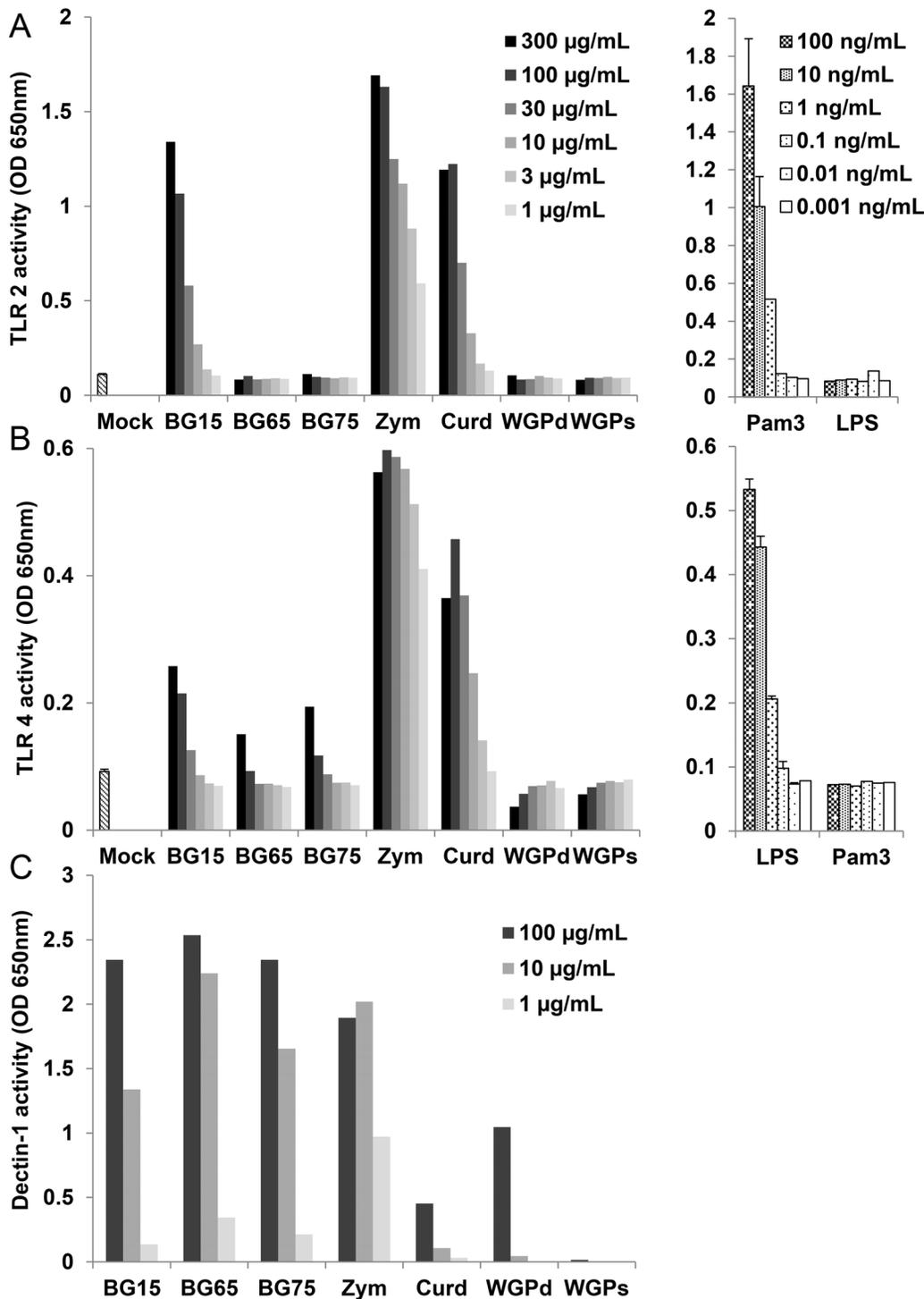


Fig 2. Enrichment of BG from yeast cell wall extracts strongly abolishes TLR2/4-related NFκB/AP-1 activities conversely to dectin-1. (A-C) HEK-Blue™-hTLR2, -hTLR4 and hDectin-1 cells were incubated with serially diluted Sc BG cell wall extracts (BG15, BG65 and BG75) or their BG controls (zymosan, curdolan, dispersible and soluble WGP) for 16 h in culture medium containing the reporter reagent (37°C, 5% CO₂). Each cell line was stimulated with a 10-fold serial dilution (from 100 ng/mL to 0.001 ng/mL) of control ligand, Pam3CSK4 for HEK-Blue™-hTLR2 and ultraPure LPS for HEK-Blue™-hTLR4, respectively as shown in the panels on the right of A and B. The NFκB/AP-1-related activity of TLR2, TLR4 and dectin-1 was assessed in supernatants by a colorimetric assay. The OD value of a blank control, which corresponds to the OD value of HEK-Blue detection medium, was subtracted from the OD values of samples. The results are presented as OD 650 nm values and are representative of three independent experiments.

doi:10.1371/journal.pone.0148464.g002

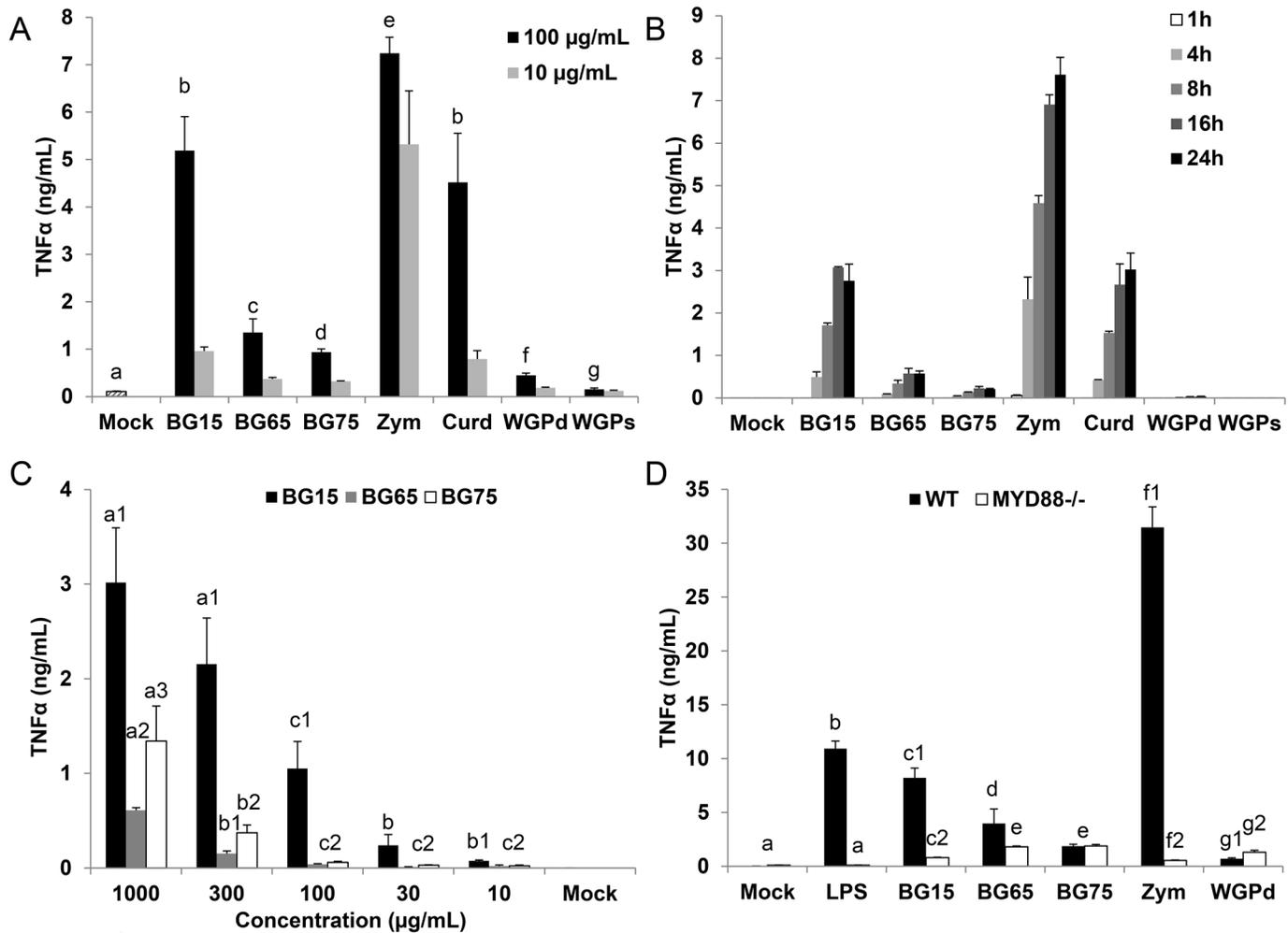


Fig 3. Murine macrophages treated with extracts enriched in BG produce less TNF α than those treated with unpurified *Sc* cell wall extracts. (A) RAW-Blue™ macrophages were treated with 100 or 10 μ g/mL of *Sc* BG extracts (BG15, BG65 and BG75) or control (zymosan, curdian, dispersible WGPd and soluble WGPs) for 16 h and TNF α was then quantified by ELISA. Comparisons are shown for BG compounds used at 100 μ g/mL. (B-C) BMDM from C57Bl/6 mice were subcultured in 96-well plates. (B) Cells were stimulated for 1, 4, 8, 16 or 24 h with 100 μ g/mL of *Sc* BG extracts (BG15, BG65 and BG75) or control (curdian, dispersible WGPd and soluble WGPs). Supernatants were collected immediately after incubation. (C) Cells were incubated for 8 h with a 3-fold serial dilution from 1000 to 10 μ g/mL of BG-purified compounds (BG15, BG65 and BG75). Supernatants were harvested immediately after incubation. (A-C) TNF α was measured using ELISA and the data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the *Student's t-test* ($p < 0.05$). (D) Immortalized BMDM (iBMDM) from WT and *MyD88*^{-/-} mice were subcultured in 96-well plates and stimulated for 8 h with 100 μ g/mL of *Sc* BG extracts (BG15, BG65 and BG75) or control (zymosan and dispersible WGPd). LPS (100 ng/mL) was used as a positive control of MyD88 activation. Supernatants were harvested immediately after each incubation time to quantify TNF α by ELISA. Data are expressed as the mean \pm SD of two independent experiments performed in triplicate. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the *Student's t-test* ($p < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0148464.g003

no difference was evidenced between these two BG-enriched compounds at lower concentrations tested (from 100 to 10 μ g/mL). The largest difference in the response of BMDM to BG15 and BG75 occurred at a concentration of 100 μ g/mL; therefore we used this concentration in the rest of the study. Given that crude *Sc* CW extracts strongly activated TLR2 and TLR4, we used *MyD88*-deficient macrophages to examine the involvement of the *MyD88*-signaling TLRs in TNF α production (Fig 3D). WT iBMDM produced more TNF α than RAW-Blue™ cells or BMDM, but the response to each compound was highly correlated between the cell types (Fig 3B and 3C) and as expected, the amounts of TNF α produced in WT iBMDM was inversely

correlated with BG content. Indeed, WT iBMDM treated with zymosan, BG15 and LPS, produced large amounts of TNF α , in contrast to those treated with WGPd or Sc CW extracts enriched in BG (BG65 and BG75). The high production of TNF α induced by zymosan, BG15 and the positive control LPS was significantly impaired, and even absent in *MyD88*-deficient iBMDM. Furthermore, loss of *MyD88* had a little or no effect on the response of cells to BG65 or BG75, which further suggests that the activation of these cells by crude extracts of Sc CW mainly depends on TLR pathways. Altogether, these results show that increasing the purity of BG in Sc CW extracts impairs the production of cytokines by macrophages.

Surface dectin-1 expression and the capacity of response to BG

It has been previously reported that BG does not signal in BMDM in contrast to peritoneal macrophages or dendritic cells due to a low dectin-1 expression and defaults in its signaling pathway [18]. We first compared the dectin-1 expression on the surface of various cell types including resident peritoneal macrophages (RPM), thioglycollate-elicited macrophages (TEPM) and BMDM, isolated from 3 murine genetic backgrounds (WT or *Clec7a*^{-/-} C57Bl/6 and DBA/2). Both freshly isolated RPM and TEPM, but also BMDM from WT C57Bl/6 and DBA/2 mice expressed high surface levels of dectin-1 in a comparison with *Clec7a*^{-/-} C57Bl/6 as a control (Fig 4A).

Expression of endogenous dectin-1 was very similar between the Raw-Blue™ cell line macrophage and primary cells, as indicated by measurement of the mean fluorescence intensity (MFI) on CD115⁺ macrophages (Fig 4B). Furthermore, surface expression was slightly higher on RPM from C57Bl/6 than RPM from DBA/2 whereas no difference could be observed between the two backgrounds on other macrophage types.

We next compared the ability of macrophages from the different sources to respond to crude or enriched Sc BG compounds. Crude BG extracts BG15 and especially zymosan, induced higher TNF α release than did enriched BG65 or BG75 (Fig 4C). Dectin-1-deficiency affects the production of TNF α in both cell types although the difference is higher with zymosan, and with BG-enriched extracts, a 10-fold diminution was noted in TEPM and BMDM (for BG65, 708 versus 61 pg/mL for TEPM, and 40 versus 6 pg/mL for BMDM in WT and *Clec7a*^{-/-} cells, respectively). Similarly, for BG75, TNF α production was 1193 versus 178 pg/mL in TEPM, and 89 versus 20 pg/mL for BMDM in WT and *Clec7a*^{-/-} cells, respectively. These data confirm the above description of low TNF α production triggered by highly-enriched BG compounds whatever the macrophage cell type.

BG-enriched Sc CW extracts stimulate the late *Clec7a*-dependent expression of CSF2

We next performed a high-throughput qPCR experiment to investigate the differential effects of crude and BG-enriched Sc CW extracts on dectin-1 pathway in BMDM. We analyzed the expression of several genes in WT and *Clec7a*^{-/-} BMDM stimulated with Sc BG compounds for different amounts of time. As expected, in both genetic backgrounds, BG15 induced the early and strong upregulation of pro-inflammatory but also anti-inflammatory genes (Fig 5). The expression of cytokine genes such as *Il1b*, *Il6* and *Il10* peaked between 4 and 8 h post-stimulation and then decreased until 16 h post-stimulation, whereas that of *Tnfa* was maximal from 4 h post-treatment. Surprisingly, *Tnfa* was upregulated by Sc BG-enriched compounds, albeit to a lesser extent than by BG15. The monocyte-attractant chemokine *Ccl2* was upregulated at 4 h post-incubation and its expression was maintained until 16 h in WT BMDM incubated with BG15 but decreased in cells treated with BG65 or BG75, showing that the expression kinetics varied depending on the gene products. Interestingly, BG-dependent gene expression was

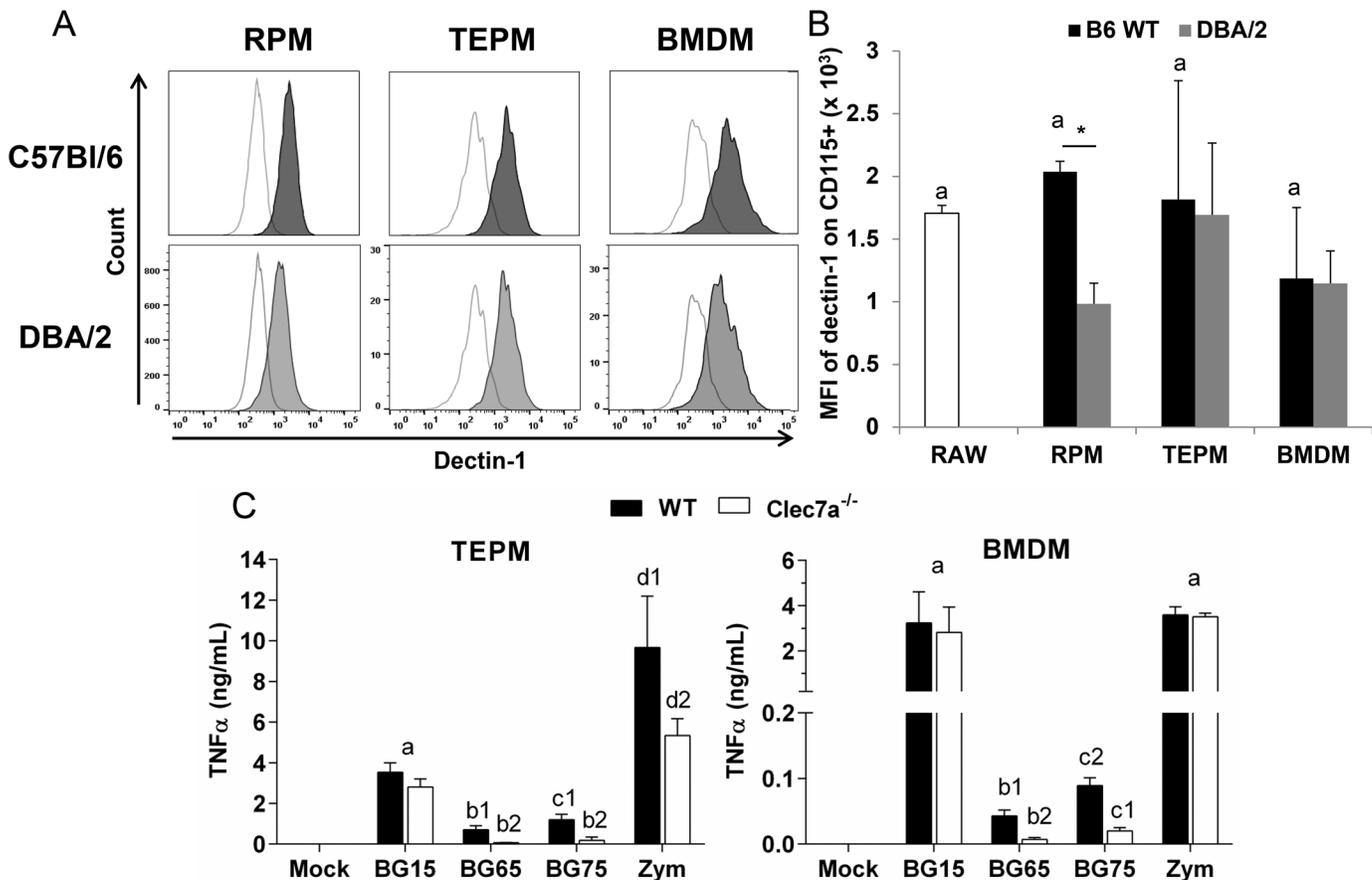


Fig 4. Murine primary macrophages including peritoneal macrophages and BMDM express similar levels of the BG receptor dectin-1 and exhibit the same ability to respond to Sc BG extracts. (A-B) Freshly isolated 4-days thioglycollate-elicited peritoneal macrophages (TEPM), resident peritoneal macrophages (RPM) and BMDM from WT and *Clec7a*^{-/-} C57Bl/6, and DBA/2 mice, and the macrophages cell line RAW-Blue™, used as control, were assessed for surface expression of dectin-1 by flow cytometry (MACSQuant™, Miltenyi Biotech, Germany). Doublets of cells were excluded at the beginning of the acquisition and a 7-AAD staining was used to discriminate death cells. The surface expression of dectin-1 was determined for each type of primary macrophages on CD115⁺ cells. (A) Data are expressed as the frequency of dectin-1⁺ among CD115⁺ cells. (B) The mean of fluorescence intensity (MFI) of dectin-1 was established on CD115⁺ cells. Results are presented as the mean ± SD MFI of dectin-1 corrected by either the MFI of isotype control for RAW macrophages, or the MFI of *Clec7a*^{-/-} C57Bl/6 for WT C57Bl/6 or DBA/2 primary macrophages. (C) Remaining TEPM and BMDM from WT and *Clec7a*^{-/-} C57Bl/6 mice isolated from these experiments were subcultured and stimulated with 100 μg/mL of crude or enriched Sc BG CW extracts (BG15, BG65 or BG75) or zymosan for 8 h (37°C, 5% CO₂). Supernatants were collected immediately after incubation and were assessed for TNFα production by ELISA. Results are shown as the mean ± SD. All data are representative of three mice per group from three independent experiments performed in triplicate. **p* < 0.05 (two-tailed unpaired Student's *t*-test); mean values not sharing the same letter are significantly different.

doi:10.1371/journal.pone.0148464.g004

severely impaired in *Clec7a*^{-/-} BMDM. Indeed, the early induction of *Il10*, *Il6*, *Tnfa*, *Il1b* and *Csf2* gene expression observed in WT macrophages was partially (BG15) or mainly abrogated (BG65 and BG75) in *Clec7a*^{-/-} cells. Intriguingly, the kinetics of *Tnfa*, *Il1b*, and *Ccl2* gene expression differed between WT and *Clec7a*^{-/-} cells. The expression of *Tnfa* and *Il1b* was delayed in *Clec7a*^{-/-} cells treated with BG15, and at 8 h the expression of these genes was lower in *Clec7a*^{-/-} than in WT cells. The expression of *Ccl2* was also delayed in *Clec7a*^{-/-} macrophages treated with BG15, but this gene was still expressed at 16 h post-incubation and was even higher in deficient cells. Interestingly, the expression of *Csf2* in WT and *Clec7a*^{-/-} cells treated with BG15 resembled that of *Il10* and *Il6*. Conversely, BG75 and to a lesser extent BG65, stimulated the late expression of *Csf2* that was completely absent in *Clec7a*^{-/-} cells. Taken together, these data demonstrate that in WT macrophages, the crude Sc CW extract BG15 triggers an earlier and stronger response than the BG-enriched Sc CW extracts BG65 and BG75 and, that

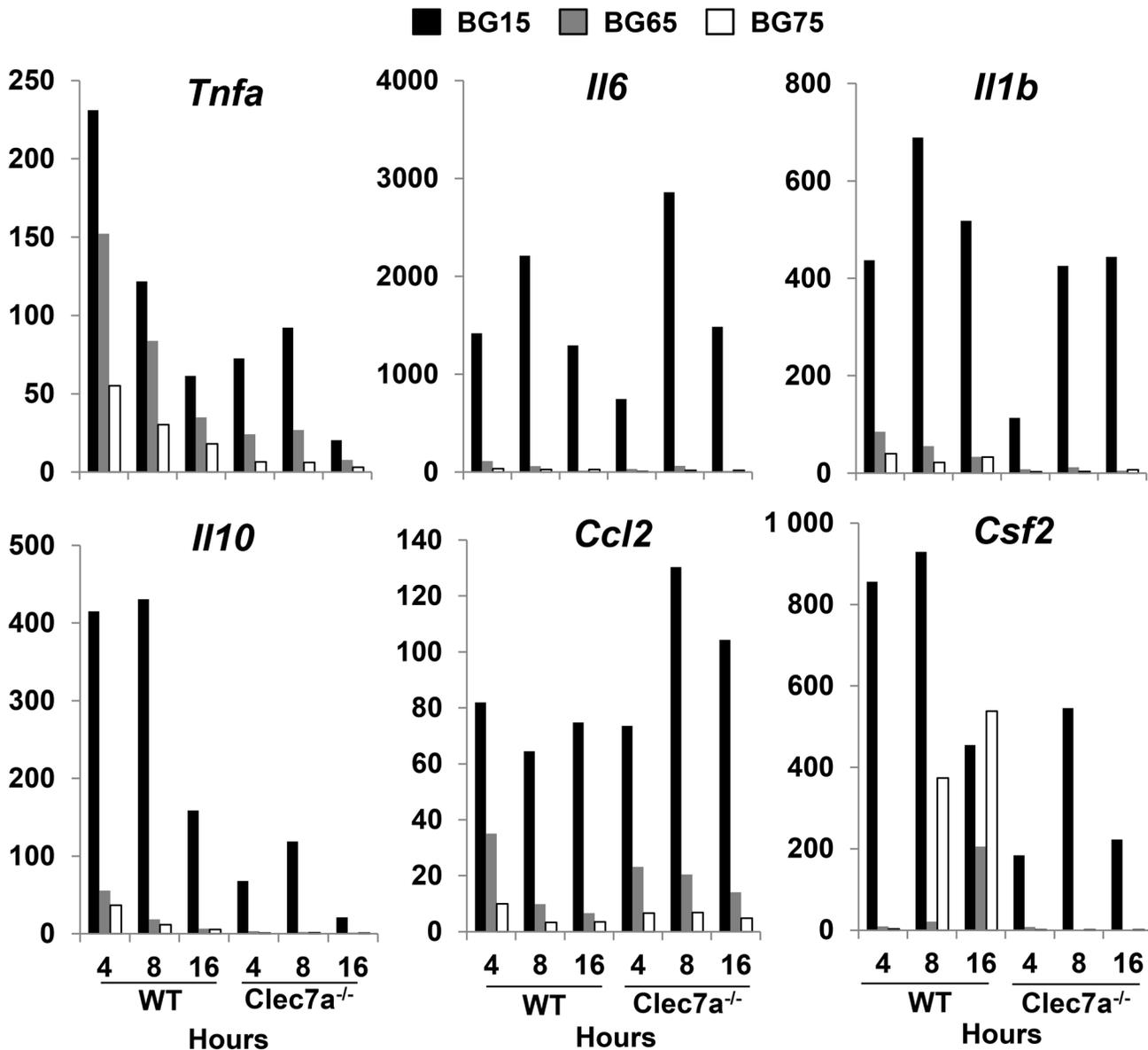


Fig 5. The timing of *Clec7a*-dependent *Csf2* expression depends on Sc BG content. WT and *Clec7a* (dectin-1)^{-/-} BMDM were stimulated with Sc BG extracts for 4, 8 or 16 h. After incubation, supernatants were removed and cells were lysed in RLT lysis buffer. Total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit and retro-transcribed with the SuperScript III First-Strand Synthesis Super Mix Kit. The expression of cytokine and chemokine genes was measured by quantitative PCR and normalized with three housekeeping genes (*Sdha*, *Rpl9* and *Hprt1*) selected with GeNorm Software. Individual quantitative PCR was performed on the LightCycler[®] 480 system (Roche, Switzerland) using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) to confirm the results obtained with the Biomark method. Data are expressed as fold change related to the mock value, representative of two experiments performed in triplicate.

doi:10.1371/journal.pone.0148464.g005

dectin-1 is required to initiate the late upregulation of *Csf2* by BG-enriched compounds. Furthermore, the response of *Clec7a*^{-/-} cells to BG15 was mainly slower and weaker than that of WT cells, indicating that dectin-1 improves the early inflammatory response in cells stimulated with BG-containing Sc CW extracts.

We also assessed the secretion of cytokines in the supernatants from WT and *Clec7a*^{-/-} BMDM incubated with crude or BG-enriched Sc CW extracts. Consistent with the gene expression profiles of WT BMDM, the crude Sc CW extract, BG15, and zymosan significantly

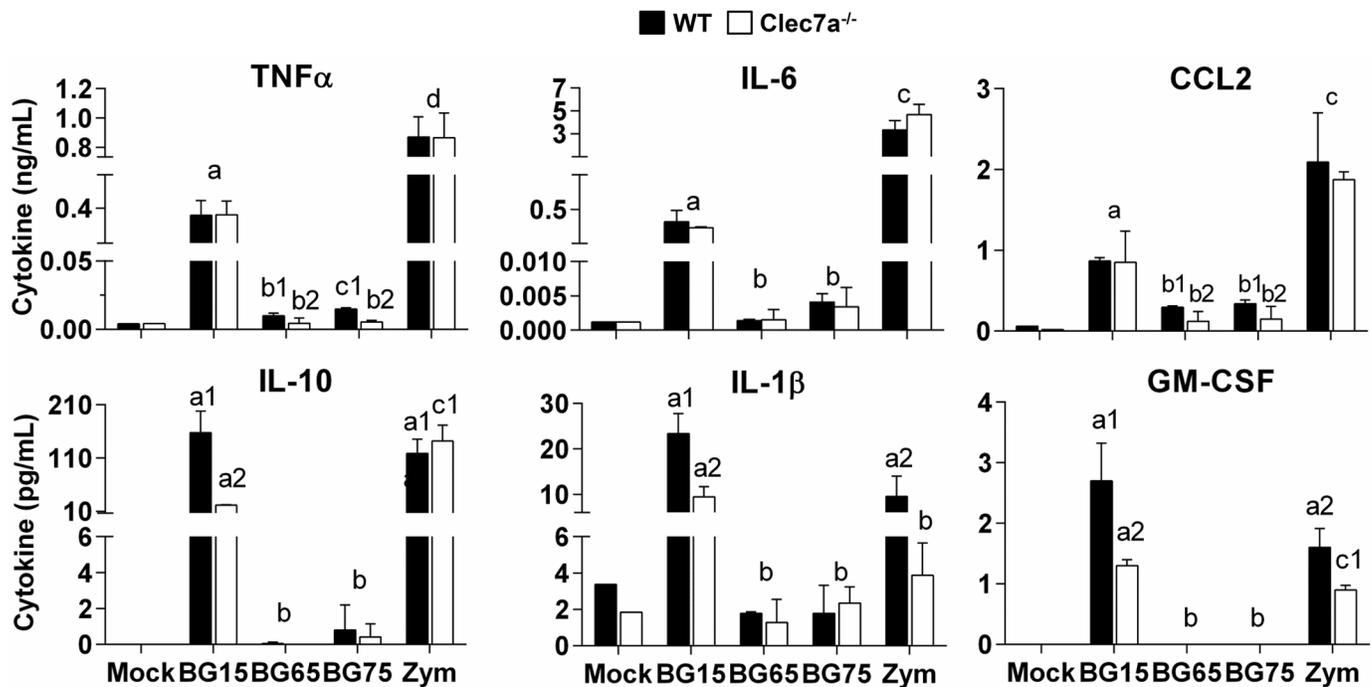


Fig 6. Sc cell wall crude products- and zymosan-induced cytokine productions are mainly dectin-1-dependent. WT and *Clec7a*^{-/-} BMDM were stimulated with Sc extracts enriched in BG for 8 h. After incubation, cell culture supernatants were harvested and stored at -20°C. Chemokines and cytokines (TNFα, IL-6, CCL2, IL-10 and IL-1β) were quantified using a customized multiplex assay and GM-CSF was measured with a cytokine detection kit. Data are expressed as the mean ± SD of three independent experiments performed in triplicate. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the Student's *t*-test (*p* < 0.05).

doi:10.1371/journal.pone.0148464.g006

induced the production of all cytokines and chemokines examined (Fig 6). In contrast, the BG-enriched Sc CW extracts, BG65 and BG75, did not significantly stimulate the secretion of these cytokines and chemokines. We also incubated WT BMDM with Sc CW extracts for longer than 8 h. Although levels of GM-CSF in BG65 and BG75-treated cells were higher at 16 and 24 h post-treatment, they remained lower than those triggered by zymosan or BG15 (Data in S3 Fig). We also performed similar experiments in *Clec7a*^{-/-} macrophages to investigate the role of the dectin-1 pathway. TNFα, IL-6 and CCL2 productions were similar in WT and *Clec7a*^{-/-} BMDM stimulated with BG15 or zymosan, but the secretion of IL-1β, IL-10 and GM-CSF was significantly lower in *Clec7a*^{-/-} cells. Similarly, although WT macrophages treated with the enriched Sc BG compounds, BG65 and BG75 produced very low amounts of cytokines and chemokines, the production of TNFα and CCL2 was significantly lower in *Clec7a*^{-/-} than in WT cells. No statistical differences were found for IL-6, IL-10 and IL-1β comparing *Clec7a*^{-/-} and WT cells response regarding BG65 and BG75 incubation. Altogether, these data suggest that the interaction between BG and dectin-1 has low stimulatory effects when the crude Sc CW extract BG15 and zymosan are used. These results further suggest that Sc CW enriched in BG extracts poorly activate cytokine production in macrophages.

Sc BG-enriched compounds poorly induce neutrophil recruitment via dectin-1

We found that the various BG compounds tested influence the activation status of macrophages, which probably affects the inflammatory response, and in particular, cell recruitment. To further characterize the effects of Sc CW compounds on the other components of the innate

immune system, we first evaluated the chemotactic properties of culture supernatants from BMDM treated with Sc CW compounds. Consistent with our previous results, culture supernatants from cells treated with the crude extract BG15 or with zymosan were significantly more chemo-attractant than their counterparts obtained from cells treated with the BG-enriched Sc CW extracts, BG65 and BG75 (Fig 7A). BG75- and BG65-conditioned medium were slightly more chemoattractant than mock control or medium alone, with a non-significant upward tendency for BG75- compared to BG65-conditioned medium. We used *Clec7a*^{-/-} cells to investigate the involvement of dectin-1 in this process. Dectin-1-deficiency severely altered the chemotactic activity of BG75-conditioned medium, which had the same effect on *Clec7a*^{-/-} cells as BG65-conditioned medium, the mock control or medium alone. Conversely, dectin-1-deficiency poorly influenced the chemotactic properties of BG15- or zymosan-conditioned medium, suggesting that the production of chemo-attractants by crude BG15 and zymosan does not depend on dectin-1 signaling.

To confirm these findings, we also performed the chemotaxis assay with supernatants of BMDM differentiated from DBA/2 mouse bone-marrow precursors because DBA/2 expresses full-length dectin-1 whereas the C57Bl/6 expresses a truncated splice variant [24,25]. Supernatants from DBA/2 cells treated with BG15 or BG65 recruited significantly more neutrophils than those from C57Bl/6 cells treated with these compounds whereas the migration of neutrophils was similar in response to supernatants derived from C57Bl/6 and DBA/2 cells treated with BG75 (Data in S4A Fig).

Furthermore, we assessed the severity of the peritoneal inflammation using the cell number ratio between recruited neutrophils and inflammatory monocytes in a peritonitis model after BG15, BG75 or zymosan challenge, as recently reported by *Lastrucci et al* [26]. For both zymosan and BG15, the cell recruitment was significantly dominated by neutrophils ($p < 0.01$) which attested to an intense inflammatory reaction (Fig 7B). In contrast, BG75 intra-peritoneal injection induced much lower neutrophil infiltration. These observations are clearly consistent with our *in vitro* results showing that crude BG15 and zymosan are strong inducers of inflammation in macrophages.

To confirm these results, we quantified the two major chemokines involved in neutrophil recruitment, CXCL1 (KC) and CXCL2 (MIP-2) in culture supernatants of macrophages stimulated *in vitro* by Sc BG compounds. Consistent with our previous observations, BMDM treated with the crude Sc CW extract BG15 or zymosan produced higher amounts of these chemokines than those treated with the BG-enriched compounds, BG65 and BG75 (Fig 7C). Again, BG75 tended to induce higher amounts of chemokine and recruit slightly more cells than BG65-conditioned medium. Intriguingly, dectin-1-deficiency did not significantly influence chemokine production in cells treated with BG15, but strongly impaired CXCL2 by BMDM treated with BG-enriched Sc CW compounds. Together, these results further suggest that crude products promote neutrophil recruitment independently of BG-dectin-1 interactions, in contrast with BG-enriched Sc CW extracts which poorly induce neutrophil recruitment via dectin-1.

Sc BG-enriched compounds strongly stimulate ROS production via CR3 but not dectin-1

We next investigate the capacity of BG extracts to modulate phagocytosis and killing, notably by producing ROS. Strikingly, ROS production within the first 30 min post-stimulation was significantly higher in WT BMDM treated with BG65 and BG75 than in those treated with crude BG15 and zymosan (Fig 7D). Conversely, curdlan and WGPd prompted macrophages to release very low amounts of ROS, similar to the levels detected in mock conditions. To determine whether the response to Sc BG compounds is mediated by the dectin-1 or the CR3

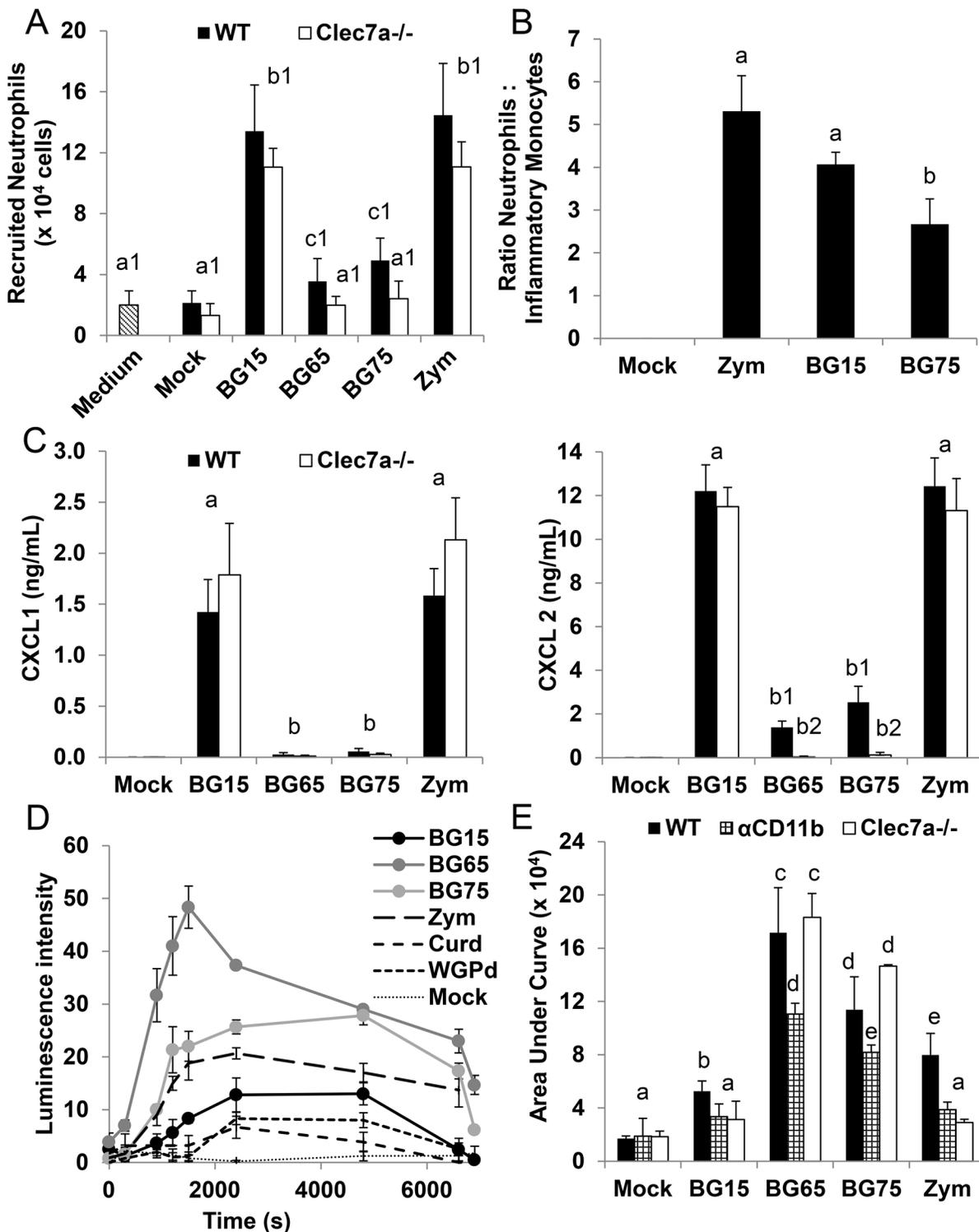


Fig 7. Sc BG-enriched extracts poorly induce neutrophil recruitment via dectin-1 but strongly stimulate ROS production via CR3 and not dectin-1. (A) Transwell chemotaxis assay to assess the chemotactic activity of supernatants from WT and *Clec7a^{-/-}* BMDM stimulated with *Sc* BG extracts (BG15, BG65 and BG75) for 8 h. BM neutrophils of WT C57Bl/6 mice (5×10^5 cells/well) were incubated for 30 min at 37°C with the supernatants and the neutrophils migrating into the lower chamber of the 96-well transwell plate were quantified by flow cytometry with an absolute counting system. Control wells containing medium (RPMI supplemented with 10% heat-inactivated FBS) were included in the chemotaxis assay. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. (B) C57Bl/6 mice ($n = 4$ /group) were challenged ip with 100 μ g of BG15, BG75 or zymosan under 500 μ L of

PBS. After 6 h of incubation, peritoneal cells were collected and the number of recruited neutrophils and inflammatory monocytes were assessed by flow cytometry as described in Material and Methods section. Data are presented as the mean \pm SD of four individual mice measurements and are representative of two independent experiments. (C) WT and *Clec7a*^{-/-} BMDM were stimulated with Sc BG extracts for 8 h. After incubation, cell culture supernatants were collected and stored at -20°C. CXCL1 and CXCL2 were quantified using a customized multiplex assay. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. (A-C) Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the *Student's t-test* ($p < 0.05$). (C-D) WT (D-E) and *Clec7a*^{-/-} BMDM (E) were subcultured in 96-well plates and incubated simultaneously with Luminol and 100 μ g/mL of Sc BG extracts (BG15, BG65 and BG75) or control (zymosan, curdlan, dispersible WGPd and soluble WGPs). ROS production was assessed immediately from the intensity of luminescence in each well, which was measured every 5 min for 2 h with a Tecan plate reader. (D) Results are expressed as the mean of luminescence intensity \pm SD of two independent experiments performed in triplicate. (E) WT BMDM were incubated for 1 h with LEAF™ anti-mouse CD11b (α CD11b) or with its rat control isotype IgG2a mAb and were then treated with BG products. Data were recorded into Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, CA) and analyzed by the area under curve (AUC) method. Levels of ROS produced by α lgG2a-WT BMDM were comparable to those of untreated cells. Results are expressed as the mean of three independent experiments performed in triplicate. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the *Student's t-test* ($p < 0.05$).

doi:10.1371/journal.pone.0148464.g007

pathways, we performed the same experiments in *Clec7a*^{-/-} BMDM and with a neutralizing antibody against CR3 (α CD11b). Surprisingly, ROS production was similar in *Clec7a*^{-/-} and WT BMDM treated with BG65 and tended to be higher (+30%) in response to BG75 in *Clec7a*^{-/-} than in WT BMDM (Fig 7E). In contrast, ROS production in response to BG15 was consistently 40% lower in *Clec7a*^{-/-} than in WT BMDM and was 64% lower in zymosan-treated *Clec7a*^{-/-} BMDM than their zymosan-treated WT counterparts. Other BG-containing compounds such as curdlan and WGPd induced ROS production neither in WT nor *Clec7a*^{-/-} cells (Data in S4B Fig). Inhibition of the CR3 pathway in BMDM with the blocking monoclonal antibody (clone M1/5) led to a moderate to severe impairment of ROS production in cells treated with BG-containing Sc CW extracts (Fig 7E). CR3 blockade impaired zymosan-stimulated and BG15-stimulated ROS production by 52% and about 40%, respectively. Interestingly, blocking the CR3 pathway in BG65- and BG75-stimulated BMDM moderately inhibited ROS production (by approximately 30%). Thus, the BG-enriched Sc CW extracts BG65 and BG75 strongly stimulate ROS production partly through the CR3 but independently of the dectin-1 pathway. Conversely, crude Sc CW extracts stimulate low but dectin-1- and CR3-dependent ROS production, despite their TLR2/4 activity. To confirm these results, we analyzed the ability of BMDM pretreated with Sc BG compounds to phagocyte and kill bacteria. Incubation with BG-enriched or crude Sc CW extracts did not appear to influence the ability of BMDM to phagocyte the *S. aureus* HG001 strain bacteria (Data in S4C Fig). However, even if no statistical differences were evidenced, macrophages incubated with BG65 or BG75 tended to kill more bacteria than those incubated with BG15 or mock. Thus, these findings, and those of our ROS experiments, suggest that Sc CW extracts enriched in BG stimulate the bactericidal activity of macrophages.

Discussion

In this study, we show that BG are not sufficient by themselves to trigger cytokine and chemokine production in various types of murine macrophages, despite promoting other activities such as ROS production and bacterial killing.

Our results suggest that dectin-1 alone is not sufficient to trigger NF κ B/AP-1 signaling in macrophages but crosstalk between dectin-1 and other PRRs, such as TLR2 and TLR4, greatly enhances NF κ B-associated cytokine production, notably when TLR signals are weak. BG make up around 50% of the *Saccharomyces cerevisiae* CW [16], and as shown here, Sc CW extracts contains a mixture of various ligands that activate other PRRs on immune cells. Upon enrichment, these PRR signals are partially or totally removed, leaving dectin-1 ligands more less intact.

Many studies have described the immuno-modulatory effects of 'β-glucans'. However, contradictory data resulting from these studies may lead to misconceptions about biological

activities of BG. These discrepancies may be explained by the heterogeneity of BG preparations, especially regarding source, degree of purity and molecular structure. For example, even the exact composition of 'zymosan' remains unclear because zymosan may differ from a provider to another, is rarely handled as supplied and may have undergone treatment before use, such as depleted zymosan that is used as a selective ligand of Dectin-1. Consequently, several properties have been unfairly ascribed to BG, which prompted us to use a triad of *Sc* CW extracts increasingly enriched in BG.

In our study, the incubation of macrophages with extracts from the same strain, substantially altered cell activation depending on the BG content. Our cell reporter assays showed that BG65 and BG75 lowly activate macrophages, notably for cytokine production, and are deprived of MyD88-related activity, despite strong dectin-1 activity. Consistently, we also showed that activation of dectin-1 poorly stimulated NF κ B-associated TNF α production. Furthermore, *Sc* CW extracts enriched in BG, especially BG75, induced the production of small but similar amounts of TNF α in WT and *MyD88*^{-/-} cells. These results seem to contrast with those of previous studies involving particulate BG, but are consistent with those showing that soluble BG has no effect on macrophages and dendritic cells [2]. Indeed, particulate BG-containing extracts, including curdlan and other *Sc*- or *Candida albicans* CW extracts, and even a synthetic 'BG' [27], has been shown to stimulate cells via the NF κ B pathway, resulting in the production of large amounts of TNF α , IL-12, -6, -10, CCL2, and MIP-2 via a dectin-1-dependent pathway [11,13,18,28,29]. *In vivo* studies also suggest that BG initiate the mobilization of immune cells (neutrophils) to the blood and other organs, like the spleen, by strongly promoting the release of cytokines and chemokines [30]. In the context of wound healing, *Sc* BG also activate NF κ B via TLR2 and dectin-1 in murine and human macrophages *in vitro* and *in vivo*, and recruit macrophages to the site of healing [31]. Thus, particulate BG-containing *Sc* CW extracts are generally thought to promote strong cellular responses. However, some studies report conflicting findings. For example, *Shah et al* found that *Sc* BG does not upregulate cytokine production (IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, TNF α) in microglia cells [32], which is consistent with the results of our study. Of note, RNA values were in lines with cytokine production for all cytokines, although slight unmeaning variation can be observed for TNF α in BG15 condition between WT and *Clec7a*^{-/-} BMDM, that could result from post-transcriptional regulation in WT cells, a mechanism previously described by several authors for this cytokine [33]. Our data were also in lines with results previously observed using depleted zymosan, showing weak IL-10 production and IL12p40 induction compared to zymosan [19,34]. This seems to suggest that BG-enriched extracts could be alike to depleted zymosan, a hot alkali-treated zymosan that activates dectin-1 but not TLR2.

Furthermore, particulate BG products have often been poorly characterized (in terms of structure, composition and source), which complicate the comparison of the results. Indeed, *Adams et al* found that the interaction of BG with dectin-1 strongly depends on the primary structure of BG, including its chain length and side-chain branching [7], such that structurally different BG may have distinct biological effects on immune cells. Furthermore, activation of dectin-1 has been shown to require the formation of a 'phagocytic synapse' on the cell membrane [17]. In addition to contain observable particles under microscope, all BG suspensions used in this study (except the soluble WGP), induced a substantial response in our dectin-1 reporter assay, even stronger than the positive control WGPd. Consistently with findings of *Goodridge et al*, this strongly suggests that our particulate BG extracts were able to trigger dectin-1 clustering. Interestingly, some authors reported that BMDM from C57BL/6 poorly express dectin-1 and this was the cause of their low responsiveness following highly-enriched BG stimulation as comparison to peritoneal cells or bone marrow-derived dendritic cells. It might be true that according to the method of *in vitro* maturation, BMDM could express significantly different

levels of the main BG receptor [35]. Indeed, *Gersuk et al* reported that cells incubated in L929 medium, that we used in this study, exhibit increased expression of surface dectin-1 compared to cells matured in recombinant M-CSF. Moreover, expression of dectin-1 on BMDM surface was observed by other authors [12,18]. Furthermore, we also assessed that BMDM, RPM, TEPM and the RAW-Blue™ cells expressed similar levels of this receptor, meaning that there is no direct correlation between dectin-1 surface expression levels and the ability of macrophages to respond to enriched-BG. This was clearly elucidated by the lower amounts of TNF α production in TEPM stimulated by BG65 and BG75 compared to BG15 and zymosan, but also in RAW cells which express high endogenous levels of dectin-1 and exhibit low NF κ B activity after BG-enriched treatment. TEPM isolated from DBA/2 also released low TNF α in response to BG65 and BG75 (data not shown), even if that mouse strain express a more active isoform of dectin-1 compared to C57Bl/6 strain [24,25]. Thus, we demonstrated that macrophages from various sources were unable to produce a robust inflammatory response following dectin-1 signaling mediated by BG-enriched treatment. This is in contradiction with the conclusion of *Goodridge et al* saying that responsiveness of BMDM from C57Bl/6 following BG binding was due to expression of additional factor which restrict dectin-1/CARD9 signaling for TNF α induction [18]. This is not taking into account the fact that BMDM are globally low responsive cells compared to resting or elicited peritoneal macrophages.

We also observed that in macrophages treated with *Sc* CW extracts enriched in BG, GM-CSF was not secreted at an early stage of the response. Instead, the expression of *Csf2* (which encodes GM-CSF) was upregulated from a late time-point according to the BG-content of extracts in WT cells that was totally abrogated in their *Clec7a*^{-/-} counterparts. It has been reported that the production of GM-CSF upon stimulation with BG-enriched *Sc* CW extracts also promotes dectin-1 expression at the surface of activated cells [18,36,37,38]. Although we observed a slight overexpression of dectin-1 induced by BG-enriched compounds (data not shown), the secretion of GM-CSF was a late consequence of dectin-1 triggering, suggesting that BG stimulate the expression of *Csf2* indirectly, by a secondary mechanism, possibly a feedback loop that remains to be deciphered.

The non-pathogenic yeast CW contains mannans, chitins and glycoproteins, as is the case for zymosan [14] and BG15. Therefore, it is important to consider the role of these molecules in the cellular responses as they can interact with other PRRs or even collaborate with dectin-1 [39,40]. For example, according to their structure, mannans are recognized by MR (Mannose Receptor), dectin-2 or even TLR4, resulting in cytokine production [6,41]. This may explain why the activity BG65 was slightly higher than that of BG75, as BG65 contains almost 4% of mannans in contrast to BG75 which mannan-content remains less than 1%. This is especially true for BG15 or zymosan that induced the release of pro-inflammatory cytokines and chemokines (TNF α , IL-6, IL-1 β , CCL2) but also the anti-inflammatory cytokine, IL-10. Furthermore, crude or poorly enriched *Sc* CW extracts have strong TLR2 and in a much lesser extent TLR4 activity, although their ability to activate dectin-1 resembles that of BG-enriched *Sc* CW extracts, indicating that the inflammatory response elicited by these crude compounds is not mediated by dectin-1 alone. *Gantner et al* [19] and several other studies have reported that zymosan activates macrophages [10,32,37,42,43]. This activity has been attributed to BG but it probably results from other cell wall components, as suggested by our experiments and also depleted zymosan versus zymosan comparisons in the literature, or from cooperative or synergistic signals. Indeed, dectin-1 and TLR2 work together to control the cellular response to microbes [29,44]. Both dectin-1 and TLR stimulate the production of TNF α and IL-12 via NF κ B in response to particulate stimuli containing zymosan, suggesting that dectin-1 is an important partner of TLR2 on macrophages. Furthermore, BMDM or BMDC from *MyD88*- or TLR2^{-/-} mice produce almost no TNF α , IL-6, -10 and -23 in response to zymosan [10,45,46],

suggesting that TLR pathways are required to trigger the pro-inflammatory response to crude Sc CW BG-containing extracts like zymosan. We also found that *MyD88*-deficiency strongly affected the ability of zymosan and BG15 to induce the production of TNF α . However, some authors conclude that dectin-1 is required to elicit an inflammatory response upon zymosan stimulation. Indeed, the overexpression of dectin-1 in RAW264.7 cells enhances TNF α and IL12p40 secretion in response to zymosan [10,19], and Taylor *et al* showed that dectin-1-deficient cells fail to release TNF α following stimulation with opsonized or unopsonized zymosan [11]. In our study, we were unable to make similar conclusions regarding the response of *Clec7a*^{-/-} BMDM to zymosan, although we observed a slightly altered production of TNF α by *Clec7a*^{-/-} TEPM receiving zymosan. Furthermore, we found that dectin-1 deficiency did not affect the production of pro-inflammatory cytokines/chemokines in response to zymosan in BMDM, except for that of GM-CSF, IL-10 and IL-1 β , an inflammasome-related cytokine which secretion was reported to be mediated through dectin-1-dependent pathway in human macrophages [47,48]. It is not surprising that IL-10 production induced by zymosan was severely impaired in *Clec7a*^{-/-} BMDM, as far as Elcombe *et al* previously described the ERK- and p38 MAPK- CREB pathways involvement leading to IL-10 release after dectin-1 engagement [34]. Our observations are also consistent with the results of Shah *et al* who reported the same effect after neutralizing dectin-1 on microglia cells [32].

We also evidenced that zymosan induced TLR4 activity in a reporter cell line, which may explain why zymosan strongly activated macrophages. The effects of BG-containing Sc CW extracts on TLR4 activity have been rarely investigated or verified upon treatment. However, a few studies report that TLR4 contributes somewhat to the effects of dectin-1 on immune cells [6,29,42,43]. Chemokine production induced by zymosan or zymosan-like extracts induces the recruitment of cells, such as monocytes via CCL2 and also neutrophils mainly via CXCL1 (KC) and CXCL2 (MIP2). Our findings suggest that these events occur in a dectin-1-independent manner. Furthermore, the macrophage inflammatory protein MIP2 is produced in large amounts by RAW264.7 macrophages and dendritic cells stimulated with curdlan [36,49]. Surprisingly, for all BG-containing Sc CW extracts tested, supernatant derived from DBA/2 cells was more chemotactic than that derived from C57Bl/6 cells, in accordance with the fact that the full length form of dectin-1 is more effective than the truncated form.

ROS production was significantly higher in BMDM treated with BG65 and BG75 than those treated with crude Sc CW extracts. ROS production was not affected by the loss of *Clec7a*, suggesting that ROS production depends on BG but is not mediated by dectin-1. However, poorly enriched compounds such as BG15 and zymosan stimulate the production of low amounts of ROS production in part via dectin-1. These findings contrast with previous studies, showing that zymosan induces strong respiratory burst in human and murine macrophages [17,19,50,51], consistent with our findings, some studies showed that macrophages produce only low amounts of ROS in response to zymosan [11] and respiratory burst induced by zymosan is severely impaired following the genetic deletion of dectin-1 [11,50,51]. Furthermore, ROS promote the induction of IL-10 in human macrophages treated with zymosan [52]. We also observed that zymosan and BG15 stimulate IL-10 expression by BMDM in a dectin-1-dependent manner (confirmed at protein levels), which is consistent with the findings of Elcombe *et al* [34]. Conversely, BG-enriched Sc CW extracts triggered the production of significant amounts of ROS but negligible amounts of IL-10 mRNA and protein, both in WT and *Clec7a*^{-/-} BMDM. This suggests that ROS production depends on BG but not dectin-1, and raises doubt about the link between IL-10 and ROS production. Instead, neutralization of CD11b (CR3) impaired ROS production by at least 30% in macrophages incubated with BG-enriched Sc CW compounds, and to an even greater extent in those incubated with crude Sc CW compounds. Thus, CR3 partially initiates respiratory burst following the recognition of unopsonized BG compounds. These

findings are consistent with several studies demonstrating that CR3 is involved in recognition and phagocytosis of nonopsonized zymosan, leading to superoxide production [53]. Furthermore, CR3 appears to be the most important receptor for phagocytosis, although dectin-1 is necessary for the optimal uptake of BG [54]. This may explain why we observed that ROS production was similar between WT and *Clec7a*^{-/-} BMDM treated with BG-enriched *Sc* CW extracts. However, we found that the inhibition of CR3 was not able to impair ROS production to levels observed with crude *Sc* CW compounds. This suggests that other(s) receptor(s) is involved in respiratory burst such as the TLR/MYD88 pathway, although *Gantner et al* demonstrated that this pathway is not linked to ROS production [19]. The phagocytic and bactericidal activity of BMDM treated *Sc* CW compounds were consistent with the amount of ROS that they produced. Consequently, BG are of great interest not only for anti-fungal, but also for anti-bacterial immunity. Indeed, *Clec7a*- deficient hosts are more susceptible to *C. albicans* infections than their WT counterparts [11]. This is consistent with the fact that BG from the pathogenic yeast *Candida albicans* are shielded from dectin-1 by outer cell wall components, allowing the pathogen to evade host immune responses [6,28,55,56].

Conclusion

In conclusion, our findings demonstrate that the recognition of *Sc* CW BG-enriched extracts by macrophages relies on C-type lectins receptors among which dectin-1 appears central. However, in absence of a concomitant TLR stimulation, the triggering of dectin-1 pathway results in a weak NFκB response and consequently the production of low amounts of pro- and anti-inflammatory cytokines. Conversely, these BG-enriched extracts are able to activate macrophages for strong respiratory burst. Despite the intense research led in this field, the events that occur following the recognition of *Sc* BG compounds by dectin-1 and other PRRs remain unclear, probably because the compounds used until now have been too poorly characterized. Considering our findings, highly BG-enriched *Sc* CW extracts may be useful in the future to determine the mechanism of action of BG to evaluate their utility as immuno-modulatory molecules.

Supporting Information

S1 Fig. *Sc* cell wall crude extract (1 mg/mL) induces the same level of NFκB activity as the optimal dose of LPS in RAW-Blue™ macrophages. RAW-Blue™ macrophages were pretreated with 10-fold serial dilutions from 1 mg/mL to 1 ng/mL of *Sc* BG extracts (BG15, BG65 and BG75) or with 100 ng/mL of ultraPure LPS for 16 h. NFκB activity was assessed by reading OD at 650nm after another 16 h incubation of cell culture supernatants with Quanti-Blue™ reagent. Data are expressed as the mean ± SD of OD at 650nm minus the background value. Two independent experiments were performed in duplicate.
(PDF)

S2 Fig. *Sc* cell wall extracts and curdlan are deprived of TLR9 activity. HEK-Blue™-hTLR9 were incubated with serially diluted *Sc* BG cell wall extracts (BG15, BG65 and BG75) or their BG controls (zymosan and curdlan) for 16 h in culture medium containing the reporter reagent (37°C, 5% CO₂). This cell line was stimulated with a 3-fold serial dilution (from 1 to 0.01 μg/mL) of control ligand, CpG ODN2006 as shown in the right panel. The NFκB/AP-1-related activity of TLR9 was assessed in supernatants by a colorimetric assay. The OD value of a blank control, which corresponds to the OD value of HEK-Blue detection medium, was subtracted from the OD values of samples. The results are presented as OD 650 nm values and are representative of three independent measurements.
(PDF)

S3 Fig. GM-CSF production by BMDM is time- and BG-dependent. WT BMDM were stimulated with Sc extracts enriched in BG for 8, 16 or 24 h. After incubation, cell culture supernatants were harvested and stored at -20°C. GM-CSF was measured with a cytokine detection kit provided by R&D Systems (France). Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the *Student's t-test* ($p < 0.05$).

(PDF)

S4 Fig. Sc BG-enriched extracts poorly induce neutrophil recruitment via dectin-1 and strongly promote bactericidal activity in a BG- but not dectin-1-dependent manner. (A) Transwell chemotaxis assay to assess the chemotactic activity of supernatants of WT and *Clec7a*^{-/-} BMDM from C57Bl/6 mice and WT DBA/2 BMDM stimulated with Sc BG extracts (BG15, BG65 and BG75) for 8 h. Bone marrow neutrophils of WT C57Bl/6 mice were incubated for 30 min with the supernatants and the neutrophils migrating into the lower chamber of the transwell plate were quantified by flow cytometry with an absolute counting system. Data are expressed as the mean \pm SD of three independent experiments performed in triplicate. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the *Student's t-test* ($p < 0.05$). (B) *Clec7a*^{-/-} BMDM were subcultured in 96-well plates and incubated simultaneously with Luminol and 100 μ g/mL of Sc BG extracts (BG15, BG65 and BG75) or control (zymosan, curdlan, dispersible WGPd and soluble WGP). ROS production was assessed immediately from the intensity of luminescence in each well, which was measured every 5 min for 2 h with a Tecan plate reader. Results are expressed as the mean \pm SD of one experiment performed in triplicate and are representative of two independent experiments. (C) The bactericidal activity of BMDM (5×10^5 cells/well in 24-well plate) primed with 100 μ g/mL of Sc BG extracts (BG15, BG65 and BG75) for 8 h was measured after infection with a GFP-expressing mutant of *S. aureus* HG001 strain at MOI 10 for 1 h, as described in the *Material and Methods*. Cells were washed, lysed in 0.1% Triton X-100 PBS and intracellular bacteria were labeled with propidium iodide (PI). Cell lysates were analyzed by flow cytometry (MACSQuant[®], Miltenyi Biotec, Germany) and the amount of live and dead engulfed bacteria were determined using the GFP⁺PI⁻ and GFP⁺PI⁺ gates, respectively (MACSQuantify[™] Software). A control sample without Gentamicin[™] was included in this assay to estimate the number of bacteria engulfed by BMDM. Data are expressed as the mean \pm SEM of two independent experiments performed in duplicate. The panel on the right shows the percentage of live bacteria phagocytized at 4 and 16 h post-challenge compared to 1 h of bacteria-cells interaction.

(PDF)

S1 Table. Primers designed for analysis of gene expression in BMDM by quantitative PCR.

(PDF)

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. R. Volmer from IHAP (INRA, Toulouse) for generously supplying us with the iBMDM cell line, Dr. A. Desquesnes from the genotyping service (Anexplo platform, INSERM/UPS006) for measuring cytokine and chemokine production using Luminex technology, Dr. A. Roulet from the GeT-PlaGe platform (INRA, Toulouse) for analyzing gene expression using Biomark HD system (Fluidigm) and Dr. D. Chevrier (InvivoGen) for analysis of dectin-1 activity of Sc BG compounds. We also thank the “Molecular and Cellular Pathogenesis of *E.coli* Infections” group of the UMR1043 (Physiology Center, Toulouse-Purpan) for allowing us to use the Tecan Infinite 200

microplate reader to measure ROS production and Dr. Y. Lippi from the GeT-TRiX platform (Toxalim, INRA, Toulouse) for helping us to determine the quantity and purity of RNA. Finally, we thank Pr. GD. Brown (University of Aberdeen) for supplying us with C57Bl/6 *Clec7a^{-/-}* mice.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: SW GT GF. Performed the experiments: SW GT. Analyzed the data: SW GT GF. Contributed reagents/materials/analysis tools: SW GT GF. Wrote the paper: SW.

References

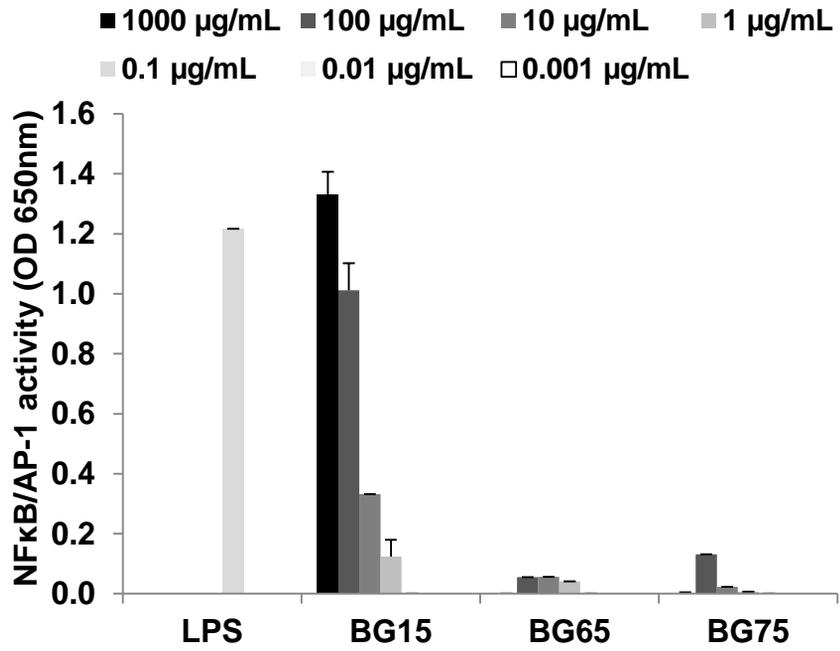
1. Riggi SJ, Di Luzio NR. Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan. *Am J Physiol*. 1961; 200: 297–300. PMID: [13741617](#)
2. Qi C, Cai Y, Gunn L, Ding C, Li B, Kloecker G, et al. Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived β -glucans. *Blood*. 2011; 117: 6825–6836. doi: [10.1182/blood-2011-02-339812](#) PMID: [21531981](#)
3. Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. *Mycol Res*. 2007; 111: 635–652. PMID: [17590323](#)
4. Munemoto Y, Iida Y, Abe J, Saito H, Fujisawa K, Kasahara Y, et al. Significance of postoperative adjuvant immunochemotherapy after curative resection of colorectal cancers: Association between host or tumor factors and survival. *Int J Oncol*. 2002; doi: [10.3892/ijo.20.2.403](#)
5. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays*. 2006; 28: 799–808. doi: [10.1002/bies.20441](#) PMID: [16927300](#)
6. Netea MG. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest*. 2006; 116: 1642–1650. doi: [10.1172/JCI27114](#) PMID: [16710478](#)
7. Adams EL, Rice PJ, Graves B, Ensley HE, Yu H, Brown GD, et al. Differential High-Affinity Interaction of Dectin-1 with Natural or Synthetic Glucans Is Dependent upon Primary Structure and Is Influenced by Polymer Chain Length and Side-Chain Branching. *J Pharmacol Exp Ther*. 2008; 325: 115–123. doi: [10.1124/jpet.107.133124](#) PMID: [18171906](#)
8. Goodridge HS, Wolf AJ, Underhill DM. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev*. 2009; 230: 38–50. doi: [10.1111/j.1600-065X.2009.00793.x](#) PMID: [19594628](#)
9. Rice PJ, Kelley JL, Kogan G, Ensley HE, Kalbfleisch JH, Browder IW, et al. Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1 \rightarrow 3)- β -D-glucans. *J Leukoc Biol*. 2002; 72: 140–146. PMID: [12101273](#)
10. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 Mediates the Biological Effects of β -Glucans. *J Exp Med*. 2003; 197: 1119–1124. doi: [10.1084/jem.20021890](#) PMID: [12719478](#)
11. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, et al. Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol*. 2007; 8: 31–38. doi: [10.1038/ni1408](#) PMID: [17159984](#)
12. Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, et al. The β -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. doi: [10.4049/jimmunol.169.7.3876](#) PMID: [12244185](#)
13. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, et al. Dectin-1 Is A Major β -Glucan Receptor On Macrophages. *J Exp Med*. 2002; 196: 407–412. doi: [10.1084/jem.20020470](#) PMID: [12163569](#)
14. Carlo FJD, Fiore JV. On the Composition of Zymosan. *Science*. 1958; 127: 756–757. doi: [10.1126/science.127.3301.756-a](#)
15. Lipke PN, Ovalle R. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *J Bacteriol*. 1998; 180: 3735–3740. PMID: [9683465](#)
16. Klis FM, Boorsma A, De Groot PWJ. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2006; 23: 185–202. doi: [10.1002/yea.1349](#) PMID: [16498706](#)

17. Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, Katsumoto TR, Ma J, Wolf AJ, et al. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a "phagocytic synapse." *Nature*. 2011; 472: 471–475. doi: [10.1038/nature10071](https://doi.org/10.1038/nature10071) PMID: [21525931](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21525931/)
18. Goodridge HS, Shimada T, Wolf AJ, Hsu Y-MS, Becker CA, Lin X, et al. Differential Use of CARD9 by Dectin-1 in Macrophages and Dendritic Cells. *J Immunol*. 2009; 182: 1146–1154. doi: [10.4049/jimmunol.182.2.1146](https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.1146) PMID: [19124758](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19124758/)
19. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*. 2003; 197: 1107–1117. doi: [10.1084/jem.20021787](https://doi.org/10.1084/jem.20021787) PMID: [12719479](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12719479/)
20. Pillemer L, Blum L, Lepow IH, Wurz L, Todd EW. THE PROPERDIN SYSTEM AND IMMUNITY. *J Exp Med*. 1956; 103: 1–13. PMID: [13278451](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13278451/)
21. Accarias S, Lugo-Villarino G, Foucras G, Neyrolles O, Boullier S, Tabouret G. Pyroptosis of resident macrophages differentially orchestrates inflammatory responses to *Staphylococcus aureus* in resistant and susceptible mice. *Eur J Immunol*. 2014; doi: [10.1002/eji.201445098](https://doi.org/10.1002/eji.201445098)
22. Sklar MD, Tereba A, Chen BD, Walker WS. Transformation of mouse bone marrow cells by transfection with a human oncogene related to c-myc is associated with the endogenous production of macrophage colony stimulating factor 1. *J Cell Physiol*. 1985; 125: 403–412. doi: [10.1002/jcp.1041250307](https://doi.org/10.1002/jcp.1041250307) PMID: [3877730](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3877730/)
23. Olivas E, Chen BB, Walker WS. Use of the Pannell-Milstein roller bottle apparatus to produce high concentrations of the CSF-1, the mouse macrophage growth factor. *J Immunol Methods*. 1995; 182: 73–79. PMID: [7769247](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7769247/)
24. del Pilar Jiménez-A M, Viriyakosol S, Walls L, Datta SK, Kirkland T, Heinsbroek SEM, et al. Susceptibility to *Coccidioides* species in C57BL/6 mice is associated with expression of a truncated splice variant of Dectin-1 (Clec7a). *Genes Immun*. 2008; 9: 338–348. doi: [10.1038/gene.2008.23](https://doi.org/10.1038/gene.2008.23) PMID: [18418396](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18418396/)
25. Viriyakosol S, Jimenez M del P, Gurney MA, Ashbaugh ME, Fierer J. Dectin-1 Is Required for Resistance to *Coccidioidomycosis* in Mice. *mBio*. 2013; 4: e00597–12. doi: [10.1128/mBio.00597-12](https://doi.org/10.1128/mBio.00597-12) PMID: [23386437](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23386437/)
26. Lastrucci C, Baillif V, Behar A, Al Saati T, Dubourdeau M, Maridonneau-Parini I, et al. Molecular and cellular profiles of the resolution phase in a damage-associated molecular pattern (DAMP)-mediated peritonitis model and revelation of leukocyte persistence in peritoneal tissues. *FASEB J*. 2015; 29: 1914–1929. doi: [10.1096/fj.14-259341](https://doi.org/10.1096/fj.14-259341) PMID: [25609430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25609430/)
27. Li X, Wang J, Wang W, Liu C, Sun S, Gu J, et al. Immunomodulatory Activity of a Novel, Synthetic Beta-glucan (β -glu6) in Murine Macrophages and Human Peripheral Blood Mononuclear Cells. *PLoS ONE*. 2013; 8: e80399. doi: [10.1371/journal.pone.0080399](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080399) PMID: [24223225](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24223225/)
28. Gow NAR, Netea MG, Munro CA, Ferwerda G, Bates S, Mora-Montes HM, et al. Immune Recognition of *Candida albicans* β -glucan by Dectin-1. *J Infect Dis*. 2007; 196: 1565–1571. doi: [10.1086/523110](https://doi.org/10.1086/523110) PMID: [18008237](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18008237/)
29. Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Wang JP, Specht CA, Levitz SM. Distinct Patterns of Dendritic Cell Cytokine Release Stimulated by Fungal β -Glucans and Toll-Like Receptor Agonists. *Infect Immun*. 2009; 77: 1774–1781. doi: [10.1128/IAI.00086-09](https://doi.org/10.1128/IAI.00086-09) PMID: [19273561](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19273561/)
30. Ito K, Masuda Y, Yamasaki Y, Yokota Y, Nanba H. Maitake beta-glucan enhances granulopoiesis and mobilization of granulocytes by increasing G-CSF production and modulating CXCR4/SDF-1 expression. *Int Immunopharmacol*. 2009; 9: 1189–1196. doi: [10.1016/j.intimp.2009.06.007](https://doi.org/10.1016/j.intimp.2009.06.007) PMID: [19573626](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19573626/)
31. Roy S, Dickerson R, Khanna S, Collard E, Gnyawali U, Gordillo GM, et al. Particulate β -glucan induces TNF α production in wound macrophages via a redox-sensitive NF κ B-dependent pathway. *Wound Repair Regen*. 2011; 19: 411–419. doi: [10.1111/j.1524-475X.2011.00688.x](https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2011.00688.x) PMID: [21518092](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21518092/)
32. Shah VB, Huang Y, Keshwara R, Ozment-Skelton T, Williams DL, Keshwara L. β -Glucan Activates Microglia without Inducing Cytokine Production in Dectin-1-Dependent Manner. *J Immunol*. 2008; 180: 2777–2785. doi: [10.4049/jimmunol.180.5.2777](https://doi.org/10.4049/jimmunol.180.5.2777) PMID: [18292498](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18292498/)
33. MacKenzie S, Fernández-Troy N, Espel E. Post-transcriptional regulation of TNF- α during in vitro differentiation of human monocytes/macrophages in primary culture. *J Leukoc Biol*. 2002; 71: 1026–1032. PMID: [12050189](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12050189/)
34. Elcombe SE, Naqvi S, Van Den Bosch MWM, MacKenzie KF, Cianfanelli F, Brown GD, et al. Dectin-1 Regulates IL-10 Production via a MSK1/2 and CREB Dependent Pathway and Promotes the Induction of Regulatory Macrophage Markers. *PLoS ONE*. 2013; 8: e60086. doi: [10.1371/journal.pone.0060086](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0060086) PMID: [23533666](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23533666/)
35. Gersuk GM, Razai LW, Marr KA. Methods of in vitro macrophage maturation confer variable inflammatory responses in association with altered expression of cell surface dectin-1. *J Immunol Methods*. 2008; 329: 157–166. doi: [10.1016/j.jim.2007.10.003](https://doi.org/10.1016/j.jim.2007.10.003) PMID: [17997408](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17997408/)

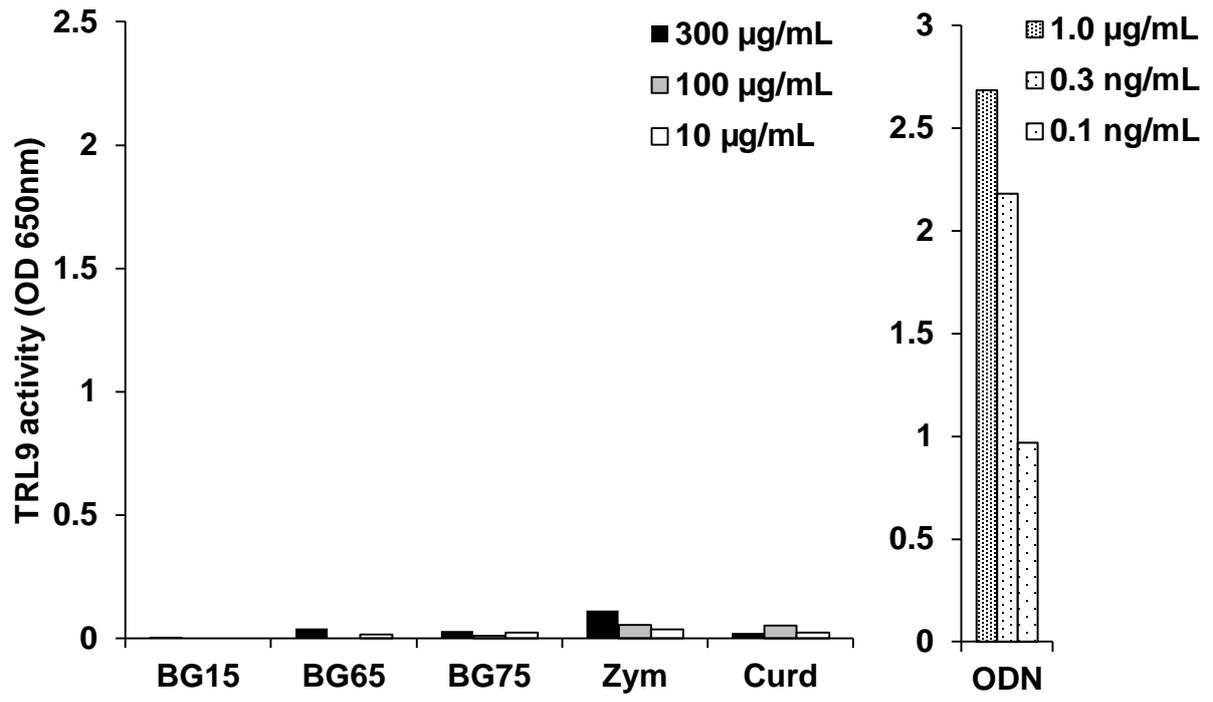
36. Min L, Isa SABM, Fam WN, Sze SK, Beretta O, Mortellaro A, et al. Synergism between Curdlan and GM-CSF Confers a Strong Inflammatory Signature to Dendritic Cells. *J Immunol*. 2012; 188: 1789–1798. doi: [10.4049/jimmunol.1101755](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101755) PMID: [22250091](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22250091/)
37. Masuda Y, Togo T, Mizuno S, Konishi M, Nanba H. Soluble β -glucan from *Grifola frondosa* induces proliferation and Dectin-1/Syk signaling in resident macrophages via the GM-CSF autocrine pathway. *J Leukoc Biol*. 2012; 91: 547–556. doi: [10.1189/jlb.0711386](https://doi.org/10.1189/jlb.0711386) PMID: [22028332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22028332/)
38. Däbritz J, Weinhage T, Varga G, Wirth T, Walscheid K, Brockhausen A, et al. Reprogramming of Monocytes by GM-CSF Contributes to Regulatory Immune Functions during Intestinal Inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2015; 194: 2424–2438. doi: [10.4049/jimmunol.1401482](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1401482)
39. Ifrim DC, Joosten LAB, Kullberg B-J, Jacobs L, Jansen T, Williams DL, et al. *Candida albicans* primes TLR cytokine responses through a Dectin-1/Raf-1-mediated pathway. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013; 190: 4129–4135. doi: [10.4049/jimmunol.1202611](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202611)
40. Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T, et al. *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida albicans*-Derived Mannan Induced Production of Tumor Necrosis Factor Alpha by Human Monocytes in a CD14- and Toll-Like Receptor 4-Dependent Manner. *Microbiol Immunol*. 2002; 46: 503–512. doi: [10.1111/j.1348-0421.2002.tb02727.x](https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.2002.tb02727.x) PMID: [12222939](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12222939/)
41. McGreal EP, Rosas M, Brown GD, Zamze S, Wong SYC, Gordon S, et al. The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology*. 2006; 16: 422–430. doi: [10.1093/glycob/cwj077](https://doi.org/10.1093/glycob/cwj077) PMID: [16423983](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16423983/)
42. Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg B-J, Netea MG, Adema GJ. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell Microbiol*. 2008; 10: 2058–2066. doi: [10.1111/j.1462-5822.2008.01188.x](https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01188.x) PMID: [18549457](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18549457/)
43. Dennehy KM, Ferwerda G, Faro-Trindade I, Pyz E, Willment JA, Taylor PR, et al. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur J Immunol*. 2008; 38: 500–506. doi: [10.1002/eji.200737741](https://doi.org/10.1002/eji.200737741) PMID: [18200499](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18200499/)
44. Yadav M, Schorey JS. The β -glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood*. 2006; 108: 3168–3175. doi: [10.1182/blood-2006-05-024406](https://doi.org/10.1182/blood-2006-05-024406) PMID: [16825490](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16825490/)
45. Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, et al. Syk-Dependent Cytokine Induction by Dectin-1 Reveals a Novel Pattern Recognition Pathway for C Type Lectins. *Immunity*. 2005; 22: 507–517. doi: [10.1016/j.immuni.2005.03.004](https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.03.004) PMID: [15845454](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15845454/)
46. Dennehy KM, Willment JA, Williams DL, Brown GD. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways. *Eur J Immunol*. 2009; 39: 1379–1386. doi: [10.1002/eji.200838543](https://doi.org/10.1002/eji.200838543) PMID: [19291703](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19291703/)
47. Öhman T, Teirilä L, Lahesmaa-Korpinen A-M, Cypryk W, Veckman V, Saijo S, et al. Dectin-1 Pathway Activates Robust Autophagy-Dependent Unconventional Protein Secretion in Human Macrophages. *J Immunol*. 2014; 192: 5952–5962. doi: [10.4049/jimmunol.1303213](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1303213) PMID: [24808366](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24808366/)
48. Kankkunen P, Teirilä L, Rintahaka J, Alenius H, Wolff H, Matikainen S. (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010; 184: 6335–6342. doi: [10.4049/jimmunol.0903019](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0903019)
49. Kataoka K, Muta T, Yamazaki S, Takeshige K. Activation of Macrophages by Linear (1→3)- β -d-Glucans IMPLICATIONS FOR THE RECOGNITION OF FUNGI BY INNATE IMMUNITY. *J Biol Chem*. 2002; 277: 36825–36831. doi: [10.1074/jbc.M206756200](https://doi.org/10.1074/jbc.M206756200) PMID: [12140296](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12140296/)
50. Underhill DM, Rosssnagle E, Lowell CA, Simmons RM. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood*. 2005; 106: 2543–2550. doi: [10.1182/blood-2005-03-1239](https://doi.org/10.1182/blood-2005-03-1239) PMID: [15956283](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15956283/)
51. Saijo S, Fujikado N, Furuta T, Chung S, Kotaki H, Seki K, et al. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol*. 2007; 8: 39–46. doi: [10.1038/ni1425](https://doi.org/10.1038/ni1425) PMID: [17159982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17159982/)
52. Kelly EK, Wang L, Ivashkiv LB. Calcium-Activated Pathways and Oxidative Burst Mediate Zymosan-Induced Signaling and IL-10 Production in Human Macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010; 184: 5545–5552. doi: [10.4049/jimmunol.0901293](https://doi.org/10.4049/jimmunol.0901293)
53. Le Cabec V, Cols C, Maridonneau-Parini I. Nonopsonic Phagocytosis of Zymosan and *Mycobacterium kansasii* by CR3 (CD11b/CD18) Involves Distinct Molecular Determinants and Is or Is Not Coupled with NADPH Oxidase Activation. *Infect Immun*. 2000; 68: 4736–4745. PMID: [10899880](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10899880/)
54. Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Agarwal S, Ram S, Rice PA, et al. Relative contributions of dectin-1 and complement to immune responses to particulate β -glucans. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012; 189: 312–317. doi: [10.4049/jimmunol.1200603](https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200603)

55. Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J.* 2005; 24: 1277–1286. doi: [10.1038/sj.emboj.7600594](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600594) PMID: [15729357](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15729357/)
56. McKenzie CGJ, Koser U, Lewis LE, Bain JM, Mora-Montes HM, Barker RN, et al. Contribution of *Candida albicans* Cell Wall Components to Recognition by and Escape from Murine Macrophages. *Infect Immun.* 2010; 78: 1650–1658. doi: [10.1128/IAI.00001-10](https://doi.org/10.1128/IAI.00001-10) PMID: [20123707](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20123707/)

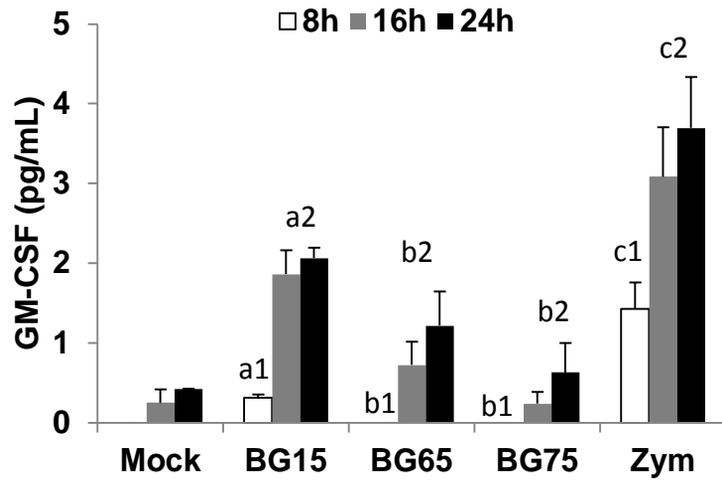
S1 Fig



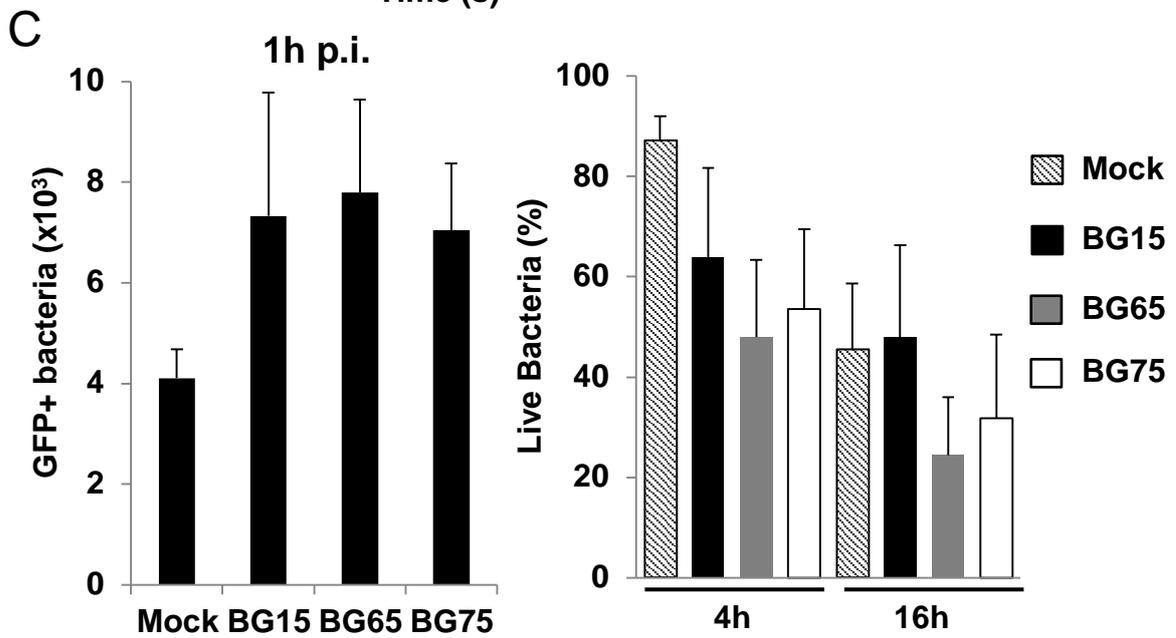
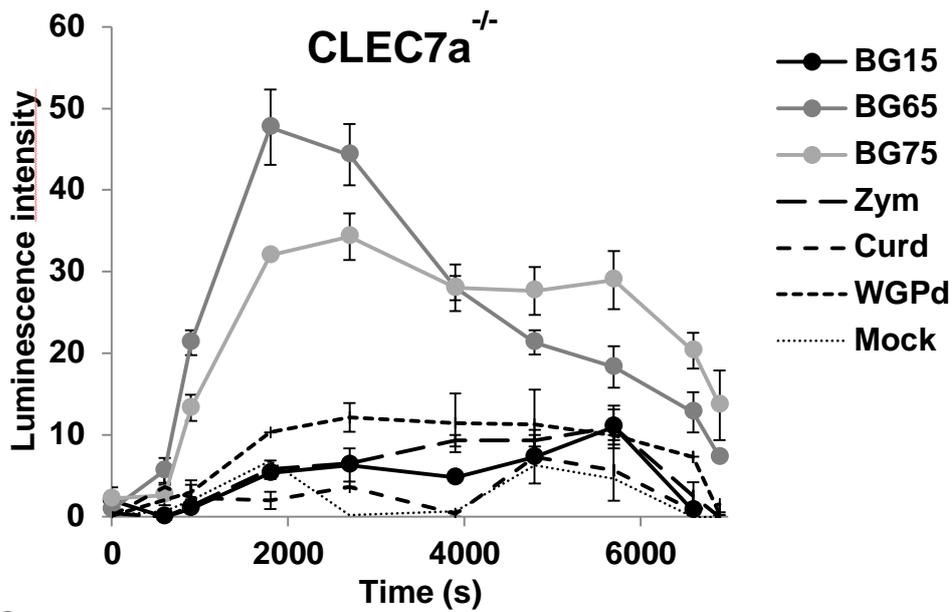
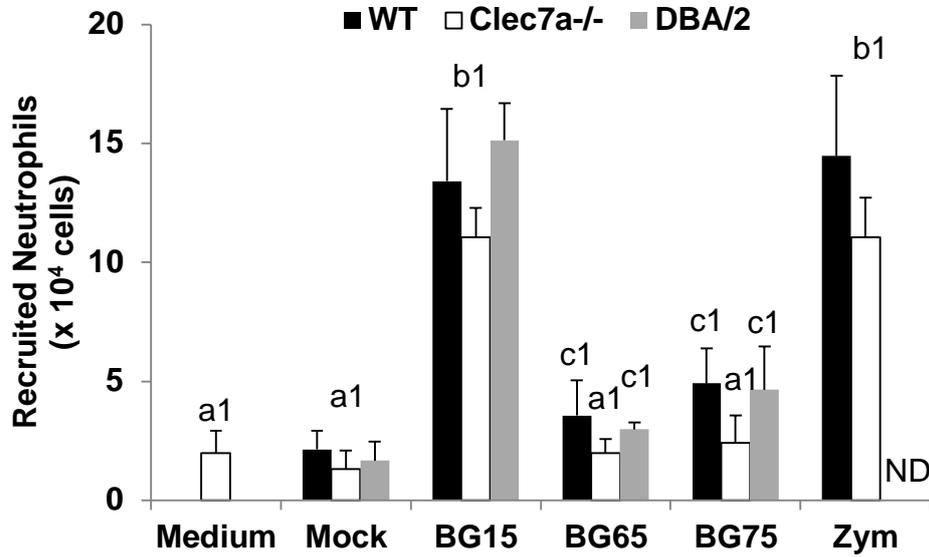
S2 Fig



S3 Fig



S4 Fig



Genes	Primers (5' -> 3')	
	Forward	Reverse
<i>TNFα</i>	CATCTTCTCAA AATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
<i>Il6</i>	GAGGATA CCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
<i>Il1b</i>	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
<i>Il10</i>	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT
<i>Ccl2</i>	CTTCTGGGCCTGCTGTTCA	CCAGCCTACTCATTGGGATCA
<i>Csf2</i>	CCGTAGACCCTGCTCGAATA	TGCCTGTCACATTGAATGAA
<i>Sdha</i>	ATTGTGCCTGGTCTGTATGC	AATTTGCTCCAAGCCGGTTG
<i>Rpl9</i>	TGGTCCCTGCTCTCAAG	GGCCTTTTCCTTCCGTTTCTC
<i>Hprt1</i>	AGGACTGAAAGACTTGCTCGAG	AATCCAGCAGGTCAGCAAAG

II.1.4 Résultats supplémentaires

II.1.4.1 La source et la structure des BG et d'autres composés pariétaux influencent l'intensité de la réponse inflammatoire des macrophages

L'analyse bibliographique présentée dans l'introduction a révélé la grande diversité des sources et des structures moléculaires des BG, notamment en termes de branchement (fréquence, type de liaison), de poids moléculaire et de solubilité. Ces paramètres varient en fonction de la source et même de la souche, mais également des procédés d'extraction utilisés. Chez les levures non pathogènes comme *Saccharomyces cerevisiae*, les BG sont majoritairement composés de liaison $\beta(1,3)(1,6)$, peuvent être solubles ou particulaires. Par une approche de criblage, la réponse induite par diverses préparations de BG et de chitosan a été évaluée à l'aide de différents systèmes cellulaires, d'une part grâce à une lignée de macrophages murins rapporteurs de l'activité NF κ B/AP-1, la lignée commerciale RAW-Blue, et d'autre part des cellules primaires dérivées de la moelle osseuse, les BMDM issus de souris C57Bl/6. Les cellules ont été stimulées pendant 16 h avec 100 ou 10 μ g/mL de préparations dont la description est présentée dans le tableau ci-dessous. En parallèle, des ligands commerciaux ont été testés à la dose optimale de 100 μ g/mL à l'exception du LPS et du LTA utilisés à la concentration optimale de 100 ng/mL. Enfin, les quantités de cytokines pro-inflammatoires TNF α et IL-6 produites ont été déterminées à l'aide de la méthode ELISA. L'activité NF κ B/AP-1 a été évaluée grâce au système rapporteur et est exprimée en unité arbitraire en fonction d'une référence externe produite avec le surnageant de cellules stimulées avec 100 ng/mL de LPS.

Référence	Détails	Origine
B20	Paroi Panification 20% BG	Levure
E60	Paroi Panification 60% BG	
F	Chitosan isolé HCl	Crustacés
G	Chitosan Particulaire	
H	Chitosan Soluble	
I	Chitosan 342	
J	Chitosan 652	
M	Parois panification	Levure



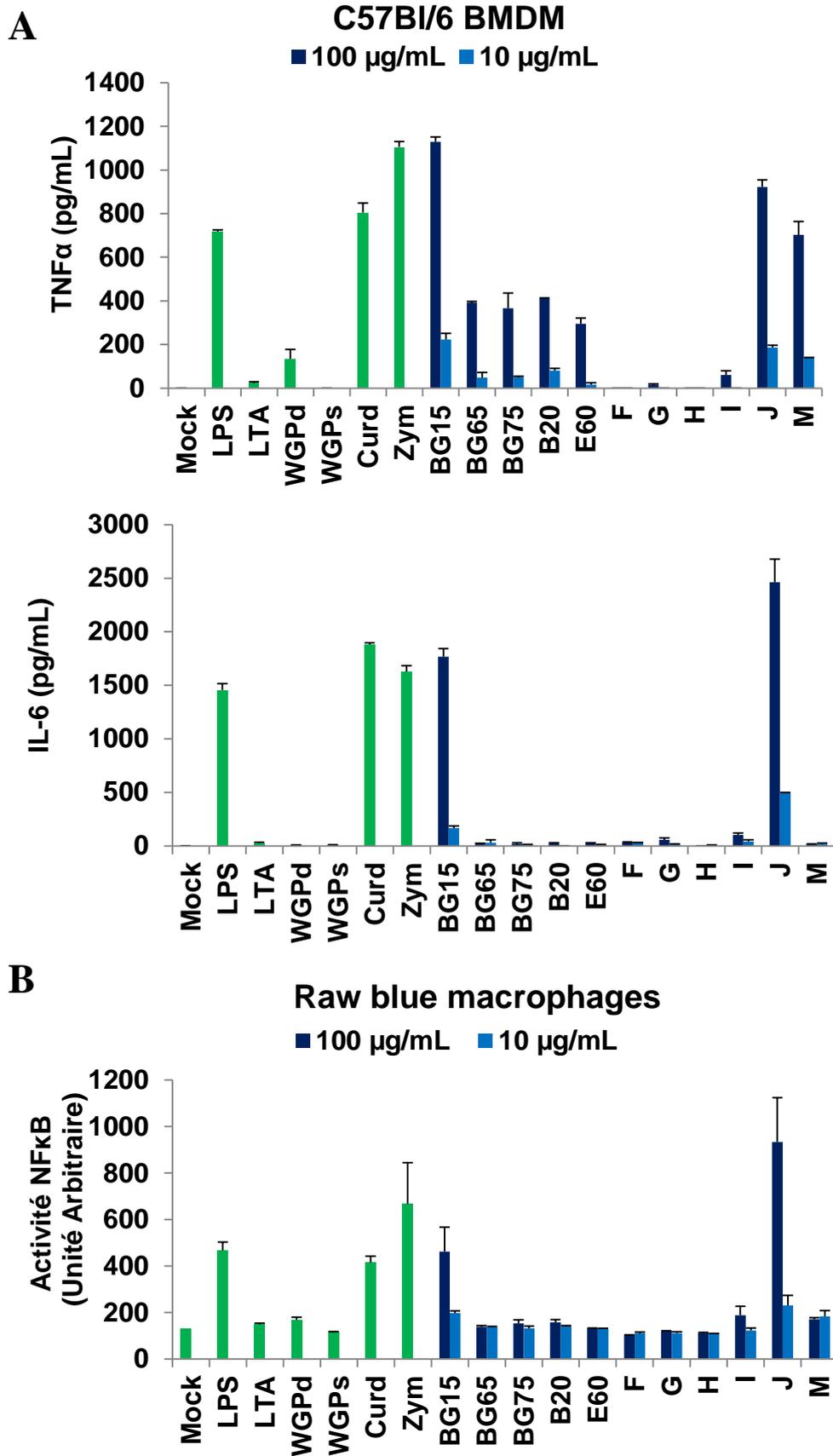


Figure II-1

Les résultats indiquent que les préparations issues des parois de levure sont hétérogènes, certaines conduisant à une réaction inflammatoire variable selon la souche et la concentration en BG (précédemment décrites dans l'article). D'une part, BG15, issu d'une souche de brasserie de *Sc* à la dose de 100µg/mL entraîne une production de TNFα et d'IL-6 élevée par les BMDM, similaire à celle du Curdlan et du Zymosan, en comparaison du LPS, le ligand de TLR4 (Figure II-1A). La forte activité NFκB associée à ces quatre composés est corrélée à l'intensité de la réponse inflammatoire qu'ils induisent (Figure II-1B). A la différence, les composés enrichis en BG à partir du BG15, BG65, BG75, de même que les composés enrichis en BG ou non d'une souche de panification de *Sc*, B20 et E60, ainsi que le WGPd induisent une production faible de TNFα, voire indétectable pour l'IL-6, dont l'activité NFκB n'est pas différente de celle de la condition sans stimulation (milieu de culture). Par ailleurs, le composé M également issu d'une souche de panification entraîne une forte production de TNFα malgré la faible activité NFκB. De façon attendue, le WGP, composé contenant des BG solubles, ne déclenche aucune production de cytokines.

Globalement, les composés contenant du Chitosan, extraits de la carapace de crustacés, particuliers, solubles ou commercial (F, G, H et I), à l'exception du composé J, n'activent pas les BMDM, ni les cellules RAW-Blue dans les conditions testées. Le chitosan 652, un produit commercialisé pour ses qualités immunostimulantes induit une forte production d'IL-6.

L'ensemble de ces résultats confirme donc la grande hétérogénéité des réponses induites par les différents composés contenant des BG, probablement en raison de leur diversité de composition et de structure provenant de sources variées et obtenus selon des procédés d'extraction différents.

II.1.4.2 Influence de la fragmentation des composés pariétaux de levure sur la réponse cellulaire des macrophages

Cette expérimentation avait pour but d'étudier l'influence de la fragmentation des parois et de la méthode de dispersion physique des préparations de *Sc* de différentes souches (brasserie versus panification) sur l'intensité de la réponse. Quatre méthodes de dispersion ont été évaluées sur les composés utilisés dans les études publiées dans l'article 1 (issus de la souche de brasserie) et sur les 2 composés issus des parois de souches de panification, B20 et E60, son descendant enrichi en BG :

- La méthode dite « **sa** » correspond à une dispersion du composé préalablement mis en solution à l'aide d'une seringue montée d'une aiguille de 26G, comprenant 20 cycles d'aspiration/refoulement.
- La méthode dite « **Biorad** » ou « Billes » correspond à une dispersion mécanique basée sur l'utilisation de billes de céramique dont la taille varie entre 1,2 mm et 1,4 mm. Le mélange billes/BG est soumis à un programme de ribolyse composé de 2 cycles de 45 secondes à 6500 rpm entrecoupés de 30 secondes dans le but de fragmenter les particules.
- La méthode dite « **Poudre** » reprend la méthode précédente mais utilise une poudre de verre formée de fines particules de verre de 0,15 mm à 0,25 mm. Le précédent programme de ribolyse est également appliqué au mélange pour disperser mécaniquement les composés pariétaux de levure.
- Enfin, « **nd** » signifie non dispersé. Les préparations sont simplement mises en solution et homogénéiser par pipetage.

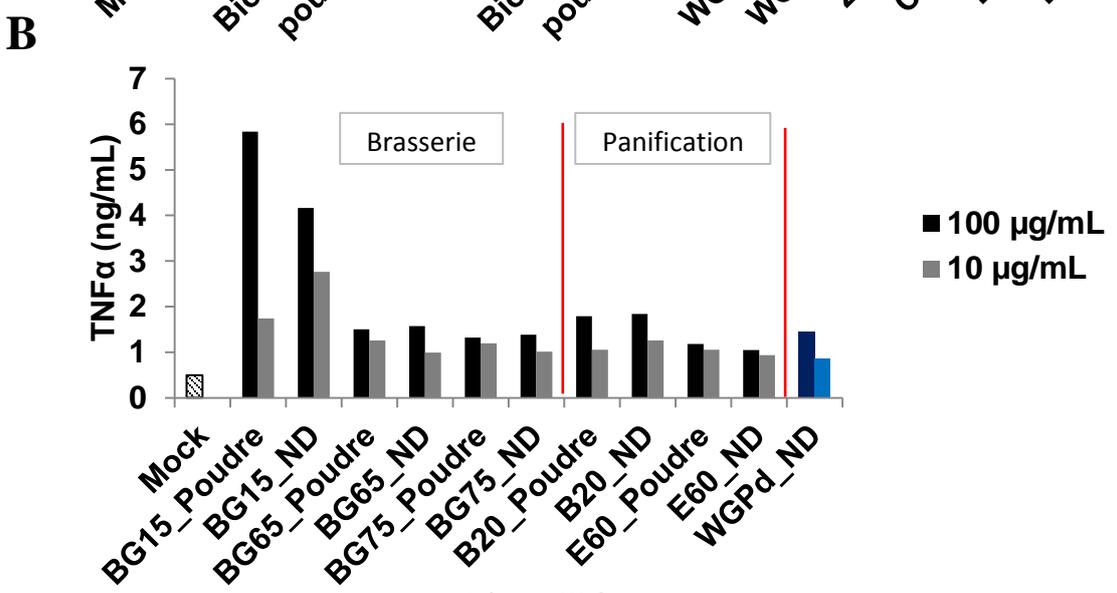
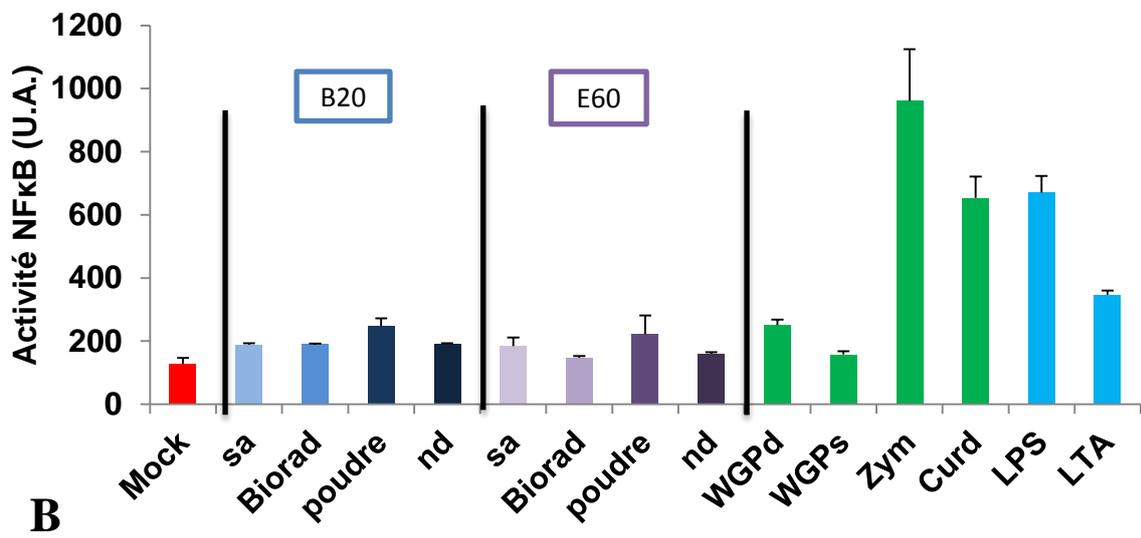
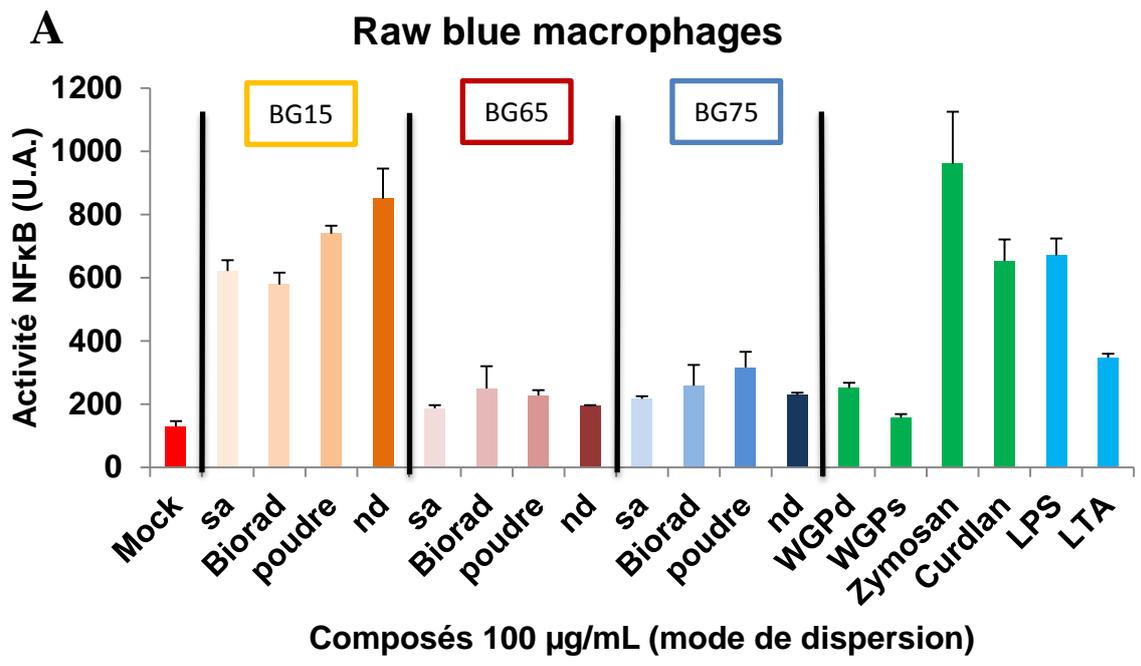


Figure II-2

Les résultats obtenus montrent que quelle que soit la méthode de dispersion utilisée, il n'existe pas de différence significative de l'activité NFκB pour une même préparation de BG à 100µg/mL (Figure II-2A). Au mieux, une tendance existe pour BG15, pour lequel l'absence de dispersion génère une réponse NFκB légèrement plus grande ; ce résultat n'est cependant confirmé qu'à la dose de 10 µg/mL pour la production de TNFα (Figure II-2B).

Par ailleurs, la quantification de TNFα dans les surnageants des BMDM stimulés par ces préparations durant 16 h à la concentration de 10 ou 100 µg/mL reflète l'activité NFκB associée à ces préparations (Figure II-2B). Aucune différence ne peut être observée entre les deux méthodes « poudre » et « non dispersé » aux deux concentrations testées. A noter que les profils cytokinique et inflammatoire restent similaires d'une étude à l'autre.

Finalement, il semblerait que les différentes méthodes de dispersion utilisées qui influencent indéniablement la biodisponibilité des particules, ne modifient pas la réponse inflammatoire mesurée *in vitro*. Les composés enrichis BG65 et BG75 sont dépourvus d'activité pro-inflammatoire comparés au BG15, le composé brut originel.

II.1.4.3 La réponse des macrophages dérivés de monocytes sanguins bovins ont une réponse cytokinique similaire à celles des macrophages murins

Dans cette expérimentation, nous nous sommes intéressés à la réponse aux BG issus de *Sc CW* des cellules primaires de l'espèce cible, *i.e.* l'espèce bovine, à laquelle nous souhaiterions transposer ce travail. En effet, la structure et les fonctions du récepteur Dectin-1 sont variables entre les espèces humaine et murine, et les réponses sont différentes en fonction du type cellulaire impliqué, *i.e.* les cellules dendritiques et les macrophages. Ici, nous avons utilisé des macrophages différenciés à partir de monocytes sanguins bovins (boMDM) selon la méthode publiée par Werling et al. [405]. Brièvement, les prélèvements de sang de bovins, dilués au 1:2 dans du milieu HBSS, ont été soumis à un gradient de Ficoll. Après, centrifugation, les PBMCs ont été collectés en PBS avant d'être mis en culture dans des poches de différenciation en Téflon (MACS®GMP Cell Differentiation Bag, Miltenyi Biotec) (10-20 mL, $4-6 \times 10^6$ PBMCs/mL) pendant 7 jours à 37°C en atmosphère humide. Les PBMCs ont été cultivés dans un milieu de culture à base de RPMI supplémenté de 1% de Sodium Pyruvate (SP), 1% d'acides aminés non essentiels (AANE), 15% de SVF décomplémenté (ou FCS, Fetal Calf Serum), 100 U/mL Pénicilline-Streptomycine et 2.5µM d'Amphotéricine B (Invitrogen). Après 7 jours de différenciation, les boMDM et autres cellules sanguines ont été collectés, centrifugés et lavés dans du milieu de culture frais.

Les boMDM ont ensuite été dénombrés à l'aide d'une cellule de Thoma et sélectionnés par adhérence pendant 16 h en plaque de culture 96 puits (1×10^5 cellules /puits) à 37°C en atmosphère humide. Les cellules non adhérentes ont été éliminées par 2 ou 3 étapes de lavage en PBS préalablement porté à 37°C. Le protocole de stimulation des boMDM est identique à celui proposé dans l'article 1. La cytokine TNFα bovine a été quantifiée dans les surnageants de culture cellulaire par ELISA (Bovine TNFα VetSet™ ELISA, KingFischer, Biotech, Inc.) après 8 h d'incubation des boMDM avec les extraits de paroi.

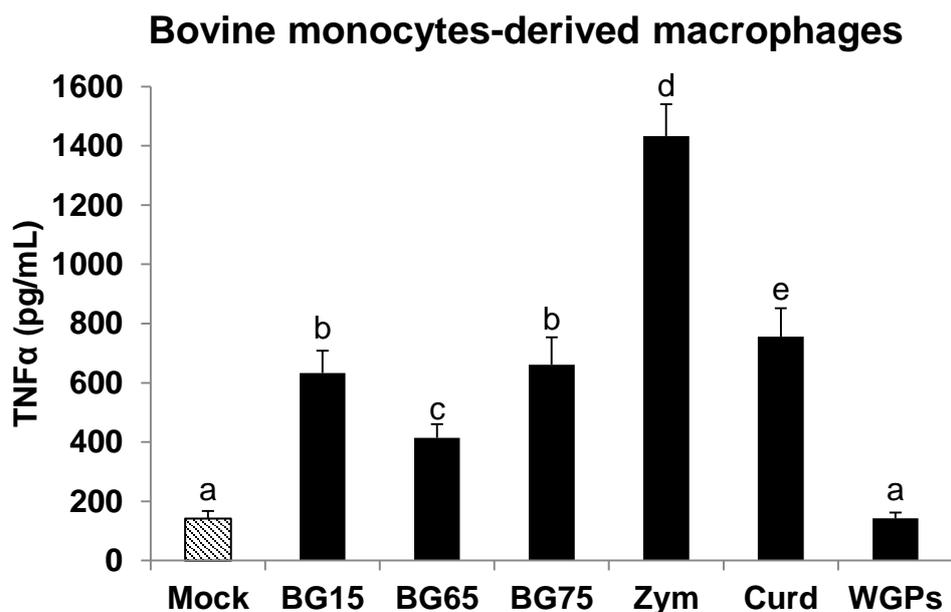


Figure II-3

De façon similaire aux expérimentations menées sur les BMDM et TEPM murins, les macrophages issus de la différenciation des monocytes sanguins bovins sont à l'origine d'une production significativement plus élevée de TNF α en réponse aux composés bruts tels que le zymosan par rapport aux extraits enrichis en BG, tels que BG65 et BG75. De même, les boMDM incubés avec le Curdlan sécrètent la cytokine, mais en quantité plus faible que les cellules traitées avec le Zymosan, tout comme les BMDM murins. Comme attendu, la forme soluble de WGP n'induit pas la production de TNF α . De façon surprenante, la synthèse de cytokine en réponse à BG15 et à BG75 n'est pas significativement différente, alors que celle de BG65 est, comme attendu, plus faible que celle de BG15.

Il semblerait donc que malgré quelques variations entre les deux types cellulaires et les deux espèces, les profils cytokiniques induits par des extraits de paroi contenant des BG soient similaires entre les BMDM murins et les boMDM. Cette observation est en accord avec les données publiées par Willcocks et al (2006) qui ont montré que la version bovine de Dectin-1 est fonctionnellement similaire aux versions humaine et murine du récepteur [406].

II.1.4.4 Les extraits enrichis en BG favorisent un phénotype correspondant à l'activation alternative du macrophage et différent de celui des extraits bruts de Sc CW

Les macrophages représentent une population cellulaire hétérogène impliquée dans une grande variété de fonctions selon leur environnement et leur localisation tissulaire. Différents phénotypes de polarisation des macrophages ont été décrits : les macrophages classiquement activés, dits M1 et les macrophages alternativement activés ou M2, qui représentent les deux extrémités d'un continuum d'activation (cf. [I.2.2.6](#)). Comme nous l'avons vu dans la revue bibliographique, les macrophages M1 ont plutôt des propriétés pro-inflammatoires alors que les macrophages M2 ont des fonctions très hétérogènes et participent à la régulation et à l'homéostasie, ainsi qu'à la réparation tissulaire.

Dans cette étude, les BMDM ont été incubés avec les extraits enrichis (BG65 et BG75) ou bruts (BG15) ou en présence du milieu de culture seul, pendant 4, 8 ou 16 h. Les cellules ont été ensuite lysées et les cDNA préparés pour des réactions de qPCR à haut débit (Biomark, Fluidigm) afin de mesurer l'expression de certains gènes considérés comme des marqueurs des deux phénotypes des macrophages.

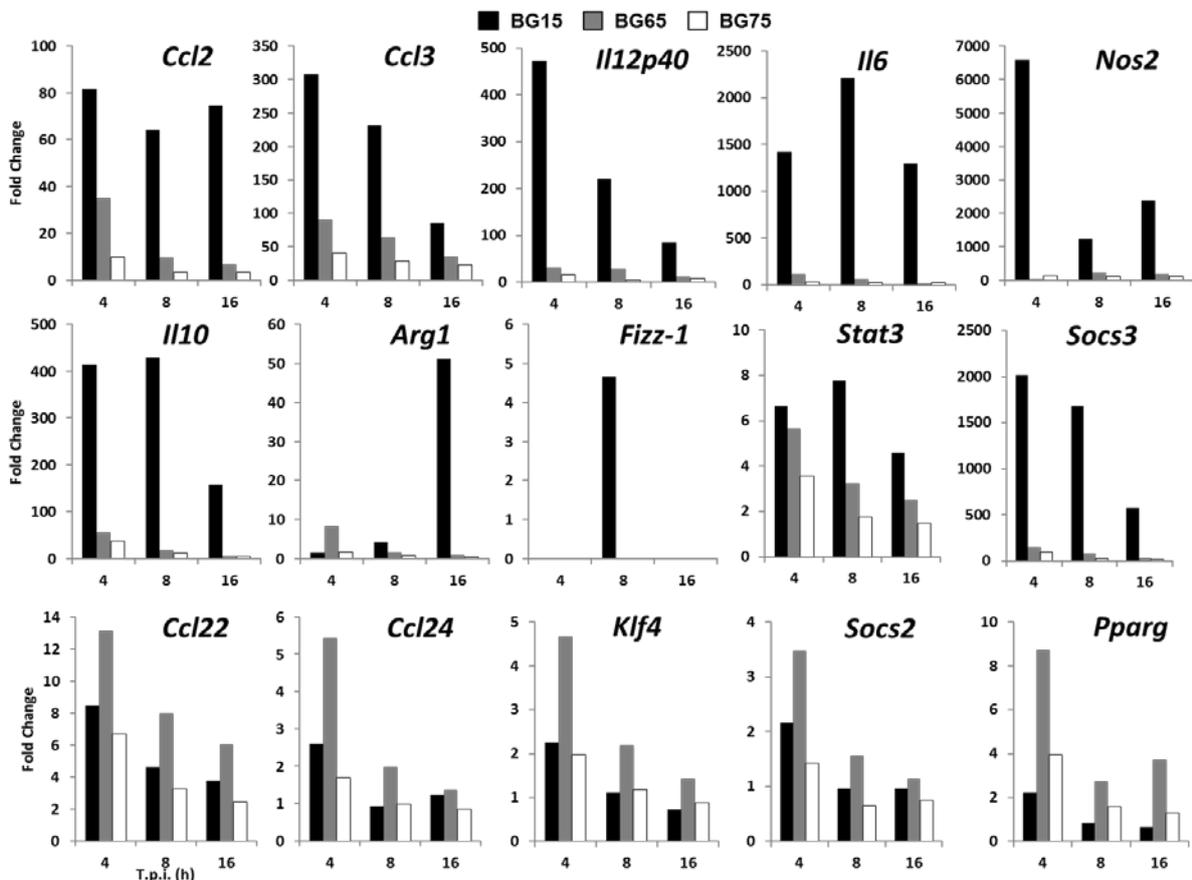


Figure II-4

L'article 1 (Figures 5 et 6) a montré que la stimulation des BMDM par BG15 initie une réponse intense et précoce, avec notamment l'expression de *Tnfa*, d'*Il1b*, d'*Il6* et de *Ccl2*, qui est très modérée voire absente dans les BMDM stimulés avec BG65 et BG75. La Figure II-4 ci-dessus (première ligne) présentent les données d'expression de gènes pro-inflammatoires incluant *Il12p40*, *Ccl3* (*MIP-1a*) et *Nos2* (ou *iNOS*), qui constituent les marqueurs du phénotype M1 [33]. BG65 et BG75 n'activent pas ou très peu ces gènes, ce qui confirme qu'ils n'induisent pas le phénotype d'activation classique de type M1, contrairement à ce qui a été montré dans une étude récente de Liu [407]. Celle-ci a révélé que leur BG particulière issu de levure, est capable d'induire un phénotype d'activation classique, de façon similaire à BG15, composé brut de paroi de *Sc*.

Par ailleurs, nous avons également constaté une forte activation du gène codant l'IL-10, qui est usuellement responsable de la polarisation M2c. De plus, dans la Figure II-4 (2nde ligne), les variations d'expression de plusieurs cytokines impliquées dans la résolution de l'inflammation et la réparation tissulaire sont présentées, notamment *Stat3* et *Socs3*. Ces deux gènes sont fortement activés par une stimulation avec BG15 et sont associés au phénotype M2c, de même que *Ccl1* et *Cxcl13* (données non présentées) probablement en réponse à l'activation d'IL10 [408]. Notons que *Socs3* est fortement et spécifiquement exprimé par les BMDM ayant reçu un traitement au BG15 alors que *Stat3* est également activé mais dans une moindre mesure par BG65 et BG75. D'autre part, *Fizz1* (*Retnla* ou *RELM-alpha*) et *Arg1*, généralement associés au phénotype M2 et au processus de cicatrisation mais aussi dans certains cas au phénotype M1 (macrophages résidents), sont fortement et exclusivement activés par BG15 et de manière tardive [408]. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le composé brut **BG15** induit une réponse inflammatoire précoce et intense de type **M1-like** (*Il1b*, *Il12p40*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Nos2*...) et qui s'oriente sous l'effet de l'activation de l'IL10 vers un phénotype pro-résolutif de « désactivation » de type **M2c** (*Stat3*, *Socs3*, *Ccl1*, *Arg1*). Ainsi, le processus d'activation d'un macrophage n'est pas figé dans le temps mais dynamique, et peut changer d'un phénotype vers l'autre en fonction du microenvironnement et du micro-organisme rencontré.

Par opposition, les BMDM incubés avec les composés enrichis, BG65 et BG75 se caractérisent par un phénotype totalement distinct de celui induit par BG15. Dans la Figure II-4 ci-dessus (3è ligne), les gènes présentés sont précocement et significativement plus fortement exprimés par BG65 que par BG15.

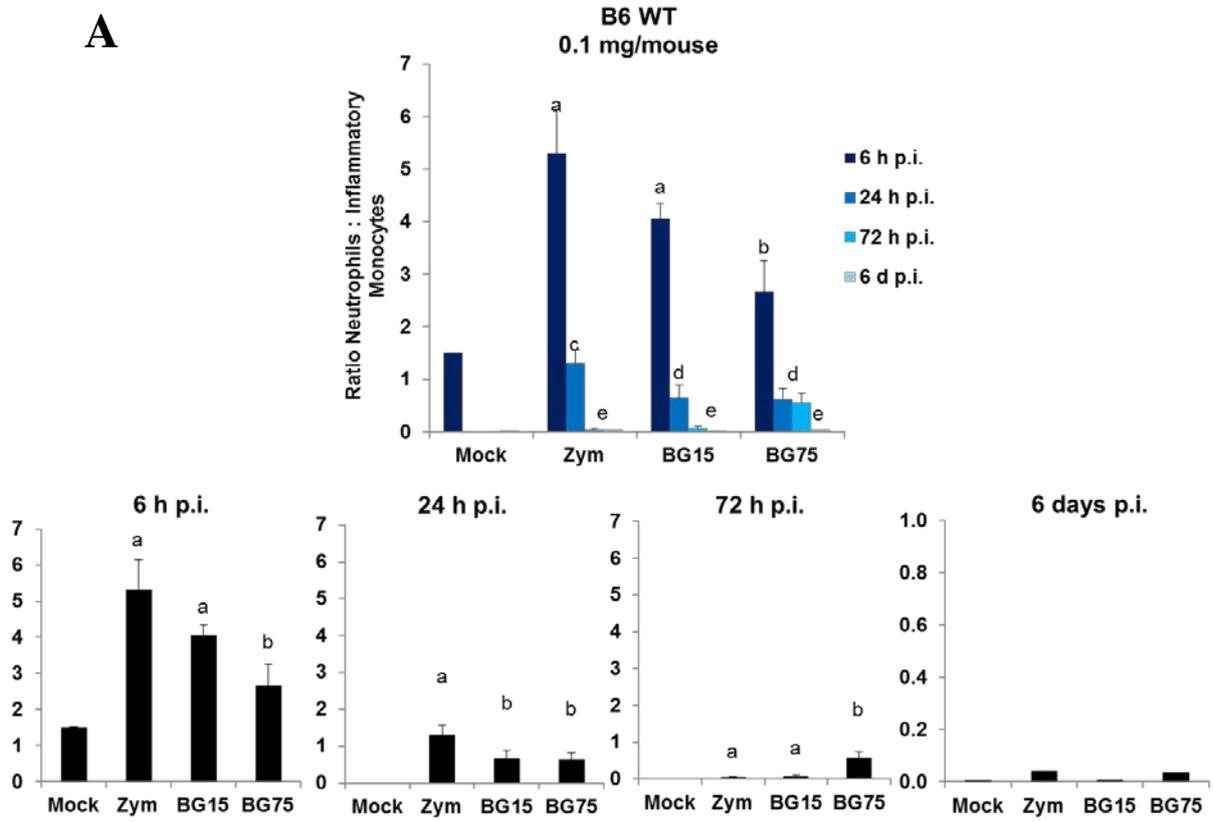
Notamment, les chimiokines *Ccl22* (MDP, Macrophage-Derived Chemokine) et *Ccl24* (Eotaxine-2), impliquées dans le recrutement des cellules T de type 2, Treg, et les éosinophiles respectivement, sont associées au phénotype M2a [33,408], et sont fortement activées par BG65 et dans une moindre mesure par BG75. D'autre part, *Socs2*, *Klf4* et *Pparg*, de même que *Stat6* (non présenté), tous associés au phénotype M2a-like, sont également des gènes précocement surexprimés suite au traitement des BMDM avec BG65, quelle que soit la durée de l'incubation. De plus, la déficience de *Klf4* entraîne une incapacité à induire des macrophages du type « M(IL-4) » ou M2a, et *Pparg* est requis pour maintenir ce phénotype [408]. Ces résultats suggèrent donc que **BG65** est à l'origine d'un phénotype de type **M2a** dit inflammatoire de type II ou alternatif, qui semble être maintenu grâce à l'activation de *Pparg*, *Stat6* et *Irf4* (non présenté). Les BMDM incubés avec BG75 ont un profil d'expression similaire à celui produit avec BG65, et expriment également plus fortement *Pparg*, ce qui laisse à penser que BG75 initie également un phénotype de type M2a mais d'intensité plus modérée.

L'ensemble de ces résultats montrent que les extraits enrichis en BG sont responsables d'un phénotype d'activation assez distinct de celui des extraits bruts et nettement moins pro-inflammatoire. Par ailleurs, l'attribution d'un phénotype d'activation précis est impossible puisqu'il s'agit d'un phénomène dynamique qui est soumis au microenvironnement des cellules ; cet état est donc plastique et fait l'objet d'une infinité de possibilités.

II.1.4.5 L'injection intra-péritonéale des extraits de *Sc* CW chez la souris induit une réponse d'intensité et de cinétique variable selon le degré d'enrichissement en BG

Le modèle de péritonite dite stérile, provoquée par le Zymosan a bien été caractérisé [409–413]. Afin de commencer à décrire la réponse induite *in vivo* par les extraits de paroi de *Sc*, bruts ou enrichis en BG, nous avons utilisé ce modèle. Il permet d'évaluer l'intensité du recrutement cellulaire dans la cavité péritonéale où les cellules peuvent être facilement collectées. Une partie des résultats de cette expérimentation, ainsi que le protocole, ont été préalablement présentés dans l'article 1 à la Figure 7b, avec un seul temps d'incubation (6 h post-injection) et une concentration donnée (0,1 mg/souris). Dans ce complément, les analyses ont été poursuivies à des temps plus tardifs (24 h, 72 h et 6 jours après- injection) (une vue globale et une vue centrée, Figure II-5A), et avec une concentration supplémentaire (1 mg/souris, Figure II-5B, panel de gauche). En outre, deux fonds génétiques différents incluant les souris C57Bl/6 *Clec7a*^{-/-} et les souris DBA/2 sont présentés (Figure II-5B, panel de droite). Brièvement, les extraits contenant des BG ont été administrés par voie intrapéritonéale (N=4 animaux par groupe) et les prélèvements ont été réalisés après 6, 24, 72 h ou 6 jours d'incubation. Après euthanasie des souris, les cellules de la cavité péritonéale ont été collectées puis analysées par cytométrie de flux à l'aide de différents marqueurs phénotypiques, Ly6G, Ly6C et F4/80, qui permettent de discriminer les neutrophiles et les monocytes inflammatoires. Les données sont exprimées en moyenne et écart-type du ratio [Neutrophiles : Monocytes inflammatoires] afin de mesurer l'intensité de la réponse inflammatoire, selon la méthode décrite par Lastrucci et al [414].

A



B

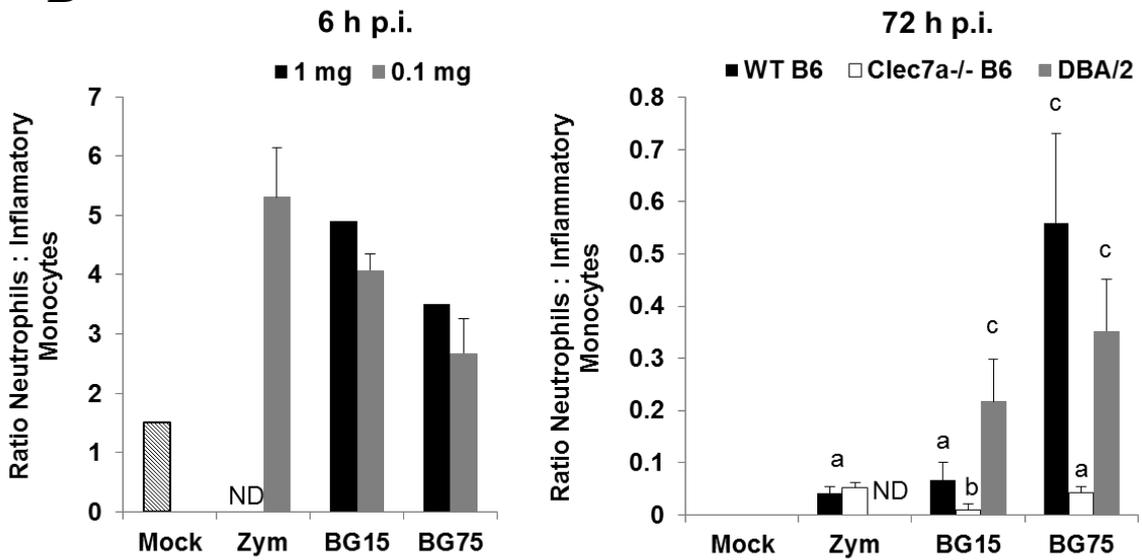


Figure II-5

Quel que soit l'extrait considéré, la réponse inflammatoire est plus intense 6 h après l'injection (Figure II-5A). Le Zymosan et l'extrait brut BG15 induisent un recrutement cellulaire notamment neutrophilique, significativement plus intense que l'extrait enrichi BG75 et ce quelle que soit la durée de traitement. A 24 h post-injection, l'intensité de la réponse inflammatoire diminue considérablement, et avec elle le recrutement neutrophilique est régulé au profit de celui des monocytes inflammatoires. Le ratio [neutrophiles : monocytes] reste plus élevé avec le Zymosan alors qu'aucune différence significative n'a été observée entre BG15 et BG75. En revanche, après 72 h, la résolution du processus inflammatoire semble être en phase terminale avec le Zymosan et BG15, alors que le ratio pour BG75 reste faible mais plus élevé. Enfin, 6 jours après l'administration, la résolution de l'inflammation (très modérée pour BG75) est définitivement achevée. Ainsi, BG75 induit un faible recrutement cellulaire qui perdure dans le temps, par rapport aux extraits bruts pour lesquels la réponse inflammatoire est plus intense mais de plus courte durée. Cela a probablement pour conséquence de limiter les dommages tissulaires associés et la stimulation chronique du système immunitaire.

L'administration d'une dose dix fois plus élevée d'extrait par voie ip (1 mg/souris) ne modifie pas significativement l'intensité du recrutement cellulaire bien qu'une tendance à l'augmentation semble perceptible (Figure II-5B, panel de gauche).

Puisque le temps 72 h p.i. montre la persistance d'une inflammation modérée pour BG75 par rapport à Zymosan et BG15, nous avons choisi d'évaluer l'influence de Dectin-1, récepteur majeur des BG, sur le recrutement cellulaire après 72 h (Figure II-5B, panel de droite). De façon intéressante et cohérente avec les résultats précédents, la déficience en Dectin-1 annihile le recrutement cellulaire induit par BG75 et réduit significativement celui induit par BG15, à cette étape d'initiation de la résolution. En revanche, le ratio cellulaire est identique pour le Zymosan en présence ou non de Dectin-1. Chez la souris DBA/2, connue pour exprimer la forme la plus fonctionnelle du récepteur, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence après injection avec BG75, alors qu'une réponse inflammatoire de plus forte intensité a été observée avec BG15.

Finalement, ces données confirment les résultats des études précédentes, les extraits enrichis en BG n'induisent qu'une réponse inflammatoire de faible intensité mais qui dépend assez fortement de Dectin-1, et de plus longue durée en comparaison des extraits bruts, Zymosan ou

BG15 qui provoquent un recrutement cellulaire intense et de courte durée suite à l'administration par voie péritonéale.

Article 2

**Dectin-1-synergism with TLR4 relies on CSF-2
expression and is regulated by FHL-2 in murine
macrophages**

En cours de soumission

II.2. Analyse du prétraitement des BG sur les macrophages murins en conditions infectieuses

II.2.1 Contexte et objectifs

Le développement d'une réponse immunitaire de nature et d'intensité appropriées passe par la détection précoce et sensible des agents pathogènes. L'initiation d'une réponse protectrice destinée à combattre les agents pathogènes est le rôle de cellules spécialisées, les macrophages et les cellules dendritiques [415]. Si certains récepteurs semblent avoir un rôle redondant, la collaboration des différents PRRs permet d'optimiser et de renforcer la réponse dirigée contre les agents pathogènes. Parmi ces collaborations, celle mettant en jeu certains TLRs et Dectin-1 est bien caractérisée, notamment parce que l'action combinée des récepteurs augmente la réponse aux agents pathogènes fongiques tels que *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* et *Pneumocystis carinii* [84,263,379,381], les mécanismes d'action restant à définir. De même, différentes études menées *in vivo* sur des souris Dectin-1^{-/-} ont démontré l'importance de ce récepteur dans la mise en place de la réponse innée vis-à-vis de ces agents [125,173,285].

Par ailleurs, la paroi de *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) est une source de BG qui a déjà fait l'objet de nombreuses études. Dectin-1 est un récepteur phagocytaire des BG qui induit la production de ROS via l'activation de kinases dont Src et Syk et du médiateur CARD9 [327,341,380]. Malgré leur complexité structurale et leur hétérogénéité, les BG sont capables de se lier à Dectin-1 et d'induire indépendamment ou en interactions avec d'autres récepteurs (TLR, NOD), différentes voies de signalisation dont celle impliquant NFκB [83,327,352], MAPK et NFAT [313,336,416]. Récemment, les BG ont été identifiés comme des molécules initiant la production de GM-CSF qui semble être responsable d'une partie de leur activité immuno-stimulante [417,418]. En effet, la capacité à activer les monocytes a été montrée à travers leur rôle dans l'adhérence, la chimiotaxie, la migration et l'explosion respiratoire, mais aussi dans l'amélioration de la survie des cellules et la clairance des micro-organismes lors des infections [419,420]. D'autre part, l'utilisation de GM-CSF en combinaison avec l'engagement de Dectin-1 induit une réponse cytokinique synergisée [322,328,421].

Malgré des avancées notables dans la compréhension et la caractérisation de l'interaction des PAMPs avec leurs PRRs, il n'y a pas à ce jour de description précise des mécanismes consécutifs à la reconnaissance des BG par leur principal récepteur, Dectin-1.

II.2.2 Résumé

D'après les études réalisées en modèle murin et chez l'homme, les BG agissent sur certaines cellules immunitaires via leur principal récepteur Dectin-1, avec comme conséquence une augmentation de la résistance de l'hôte vis-à-vis de certains agents pathogènes. Dans l'article précédent, nous avons montré que l'engagement exclusif de Dectin-1 permis par les BG présents dans des extraits de paroi de *Saccharomyces cerevisiae* ne suffit pas à induire la production de cytokines inflammatoires. En revanche, l'engagement simultané et le dialogue collaboratif entre Dectin-1 et un ou plusieurs TLRs (comme dans le cas du Zymosan ou de l'extrait de paroi brut BG15), sont à l'origine d'une activation des macrophages. Ces signaux requièrent la présence de la protéine MyD88. Ce co-engagement est associé à l'expression de gènes pro- ou anti-inflammatoires résultant de l'intégration des différents signaux, ainsi que l'activation du facteur de transcription NFκB.

Afin d'évaluer les propriétés immuno-modulatrices des BG, nous avons analysé les effets de la pré-incubation des cellules avec les différentes préparations contenant des BG sur la réponse des macrophages à une stimulation avec des bactéries ou un ligand de TLR. Cette caractérisation a été réalisée à différentes échelles : (i) une première description phénotypique de la réponse cellulaire et de l'influence de Dectin-1 sur cette activation, puis (ii) une approche transcriptomique visant à identifier l'expression des gènes en réponse au double stimulus.

Nous avons ainsi montré que le traitement préalable des macrophages avec des extraits de *Sc* enrichis en BG induit une production cytokinique robuste et de plus forte intensité lors de l'exposition ultérieure à un ligand bactérien comme le LPS ou à une bactérie vivante, par rapport aux résultats obtenus avec des extraits bruts de paroi tels que le Zymosan ou BG15, ou en l'absence de traitement. De plus, une étude cinétique a permis de montrer que cette réponse synergique obtenue avec des BG enrichis est un processus tardif sans modification de l'activité NFκB et qui requiert probablement une synthèse protéique *de novo*.

Afin d'identifier les facteurs impliqués et les mécanismes mis en jeu dans cette réponse, une analyse transcriptomique a été réalisée. Pour cela, des macrophages ont été préalablement traités avec BG15, BG65 et BG75, puis stimulés avec une dose optimale de LPS. L'analyse des transcrits a permis de mettre en évidence deux phénotypes distincts selon le prétraitement réalisé (sans prétraitement ou BG15 versus BG65 ou BG75), ainsi que l'expression de

nombreuses cytokines/chimiokines et facteurs de transcription spécifiquement associés à chaque type de composés. En particulier, *Fhl2* et *Csf2* ont été identifiés comme étant des gènes dont l'expression est corrélée au traitement par BG65 et BG75. L'absence de Dectin-1 entraîne une altération significative de la production de GM-CSF (codé par *Csf2*), de l'induction de *Fhl2*, de même que celle d'autres cytokines.

Ces résultats indiquent donc que la voie de signalisation en aval de Dectin-1 joue un rôle crucial dans l'immunité microbienne puisqu'elle confère une signature inflammatoire intense au macrophage ; cette expression n'apparaît qu'à la suite de l'exposition à un stimulus secondaire, comme l'engagement d'un récepteur TLR sur le macrophage. De plus, nous avons identifié pour la première fois l'implication de *Fhl2* en tant que régulateur de l'activation du macrophage suite à un traitement par des BG.

II.2.3 Article 2

1 **Dectin-1-synergism with TLR4 relies on CSF-2 expression and is regulated by FHL-2 in**
2 **murine macrophages**

3 Sarah Walachowski^{1,2}, Guillaume Tabouret^{2,1*}, Gilles Foucras^{1,2* ‡}

4 ¹ Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR 1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France

5 ² INRA, UMR1225, IHAP, F-31076 Toulouse, France

6 ‡ *Corresponding author*

7 Gilles Foucras

8 Université de Toulouse, INP, ENVT, UMR 1225, IHAP, 23 chemin des Capelles, 31076

9 Toulouse Cedex, France. Tel: +(33) 561 193 902 / Fax: +(33) 561 193 834 - Email:

10 g.foucras@envt.fr

11 **Keywords**

12 Yeast cell wall, *Saccharomyces cerevisiae* β -glucans; macrophages; inflammatory response;
13 dectin-1 receptor; cytokine; PAMPS cooperation; synergy

14 **Abbreviations**

15 BG, β -glucan; Curd, curdlan; iBMDM, immortalized BMDM; NEAA, non-essential amino
16 acids; Pam3, Pam3CSK4; PAMP, pathogen-associated molecular receptor; Pen-Strep,
17 penicillin-streptomycin; PRR, pattern recognition receptor; SEAP, secreted embryonic
18 alkaline phosphatase; *Sc*, *Saccharomyces cerevisiae*; TEPM, thioglycollate-elicited peritoneal
19 macrophages; WGPd, dispersible whole glucan particle; WGPs, soluble whole glucan
20 particle; WT, wild type; CW, cell wall; Zym, zymosan

21 **Abstract**

22 Human and murine studies showed that β -glucans (BG) interact with dectin-1, their main
23 receptor on certain immune cells to improve host immunity against pathogens. In a recent
24 study, we reported that eliciting dectin-1 pathway exclusively, using BG-enriched
25 *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) cell wall (CW) extracts, was not sufficient to trigger cytokine
26 production. In contrast, the simultaneous and collaborative crosstalk between dectin-1 and
27 TLR signaling, arising upon zymosan or crude *Sc* CW extracts exposure, induced Myd88-
28 dependent activation of macrophages and shaped distinct gene expression patterns. Here, we
29 showed that BG-enriched extracts induced a robust and synergistic production of cytokines in
30 BMDM toward a secondary TLR-related stimulus from ligands or live bacteria as compared
31 to crude BG extracts treated- or untreated cells. The BG-specific synergism required a late
32 mechanism without modification of NF κ B signaling. In addition, a transcriptomic analysis
33 identified a variety of cytokines, chemokines and as well as transcription factors upregulated
34 in BG-primed BMDM including *Csf2* and *Fhl2*, the most emphasized of them. Most
35 importantly, dectin-1-deficiency sharply abrogated the expression of these genes as well as
36 cytokine production in BG-enriched priming conditions. Furthermore, these are the first
37 results to identify *Fhl2* as a regulator of the dectin-1 pathway. Our data clearly indicate that
38 dectin-1 pathway confers a strong inflammatory signature to macrophages only upon a
39 secondary stimulus.

40

41 **Introduction**

42 The immune system has the complex task of detecting invading pathogens, a critical step in
43 triggering defense mechanisms. For that, the immune system has evolved an elaborated
44 system of pathogen surveillance with a wide variety of receptors also referred as PRRs
45 (Pathogen Recognition Receptors) encompassing TLRs, CLR-like Dectin-1, scavenger
46 receptors, mannose receptors (MR) amongst others [1,2]. These receptors are able to
47 recognize highly conserved molecular patterns (PAMPs) expressed by microbes in order to
48 shape the most appropriate immune response. Initiation of a protective response against
49 pathogens is the activity of specialized cells like macrophages and dendritic cells [3].
50 Collaboration of several PRRs is known to increase the responsiveness of immune cells and
51 strengthen the response to pathogens. Amongst them, the collaboration between TLRs and the
52 C-type lectin Dectin-1 has been characterized in the past and shown to increase the response
53 to pathogenic fungi as *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* and *Pneumocystis carinii* (as
54 reviewed in [3]), [4–9], although the mechanisms are still poorly defined.
55 Dectin-1 is essential for the innate response to fungal pathogens, as demonstrated in vivo by
56 several authors using knock-out mice [10–12]. Indeed, Dectin-1 is the phagocytic receptor for
57 β -glucans (BG) particles internalization that leads to ROS production via Src and Syk-
58 CARD9 kinases signaling [13–15]. BG are glucose polymers that have a backbone of linear
59 β (1-3)-linked D-glucose molecules (β (1-3)D-glucan) and also β (1-6)-linked side chains that
60 occur at different interval along the backbone [16]. Although their complexity and
61 heterogeneity, BG are able to bind to dectin-1 and signal in collaboration or not through
62 pathways, including NF κ B [14,17,18], MAPK and NFAT [19–21]. Moreover, BG have been
63 shown to stimulate the production of GM-CSF that mediates part of their booster activity
64 [22,23]. *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) is another source of BG and availability of industry
65 byproducts containing BG incites to evaluate the possibility to exploit these resources as

66 immunostimulants. Recently, GM-CSF was identified as a potent activator of monocytes
67 supporting adherence, chemotaxis, migration and oxidative burst in vitro but also improving
68 cell survival and clearance of microorganisms during infections [24,25]. In collaboration with
69 Dectin-1 engagement, GM-CSF was shown to synergistically and robustly initiate a BG-
70 specific inflammatory response [22,23,26,27].

71 Despite the progress in understanding the interaction of some fungal PAMPs with PRRs, there
72 is no integrated view of the mechanisms by which dectin-1 specifically signals after *Sc* BG
73 recognition, probably due to the heterogeneity of BG-content and the various methods used in
74 studies.

75 We previously demonstrated that particulate BG-enriched compounds-treated macrophages
76 become bactericidal and secrete ROS [28]. Remarkably, unlike what is generally accepted,
77 BG-enriched *Sc* CW extracts on their own, only elicit low or no relevant cytokine or
78 chemokine production in murine macrophages. Since the promoted activity of BG is
79 recognized, we sought to decipher how BG are able to modulate macrophage responsiveness
80 to tailor innate response to a primary signal, from a TLR.

81 In the present study, we demonstrated that BG-enriched *Sc* CW extracts can effectively
82 increase murine macrophages responsiveness to TLRs and whole bacteria, leading to a
83 synergistic increase in TNF α and Il-1 β production, and identified candidate genes and
84 mechanisms associated with the synergistic effect.

85 **Materials and Methods**

86 **Reagents**

87 Cell culture media RPMI 1640 GlutaMAX™ and DMEM GlutaMAX™, PBS, Non-Essential
88 Amino Acids (NEAA), sodium pyruvate and antibiotics (Penicillin-Streptomycin (Pen-
89 Strep™), Gentamicin™, Normocin™ and Zeocin™) were purchased from GIBCO (Life
90 Technologies). Fetal Bovine Serum (FBS) was provided by Eurobio, France. Zymosan (zym),
91 particulate (WGPd) and soluble glucan-enriched compound (WGPs, Biothera) and curdlan
92 (curd), a linear β 1,3-glucan extracted from *Alcaligenes faecalis*, synthetic triacylated
93 lipoprotein Pam3CSK4 and ultraPure lipopolysaccharide (LPS) from E. coli O111:B4 were
94 purchased from InvivoGen (France). BG compounds of interest were extracted from the same
95 strain of *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*) owned by Phileo-Lesaffre Animal Care. Their
96 composition was already described in a recent study [28].

97 **Animals**

98 WT C57Bl/6 and DBA/2 mice were purchased from Janvier Labs (St Berthevin, France) and
99 *Clec7a*^{-/-} mice [11] were originally provided by Pr. Gordon Brown (University of Aberdeen,
100 Scotland) and were bred in-house. *Fhl2*^{-/-} mice were provided by Dr. Y. Wei (Pasteur
101 Institute, Paris, France). Eight to 12-week old C57Bl/6 *Clec7a*^{-/-} or *Fhl2*^{-/-} mice and their
102 strain-matched WT controls from both sexes, and female DBA/2 mice were housed under
103 pathogen-free conditions in an accredited research animal facility of the National Veterinary
104 College (UMR IHAP, Toulouse, France). This study was carried out in strict accordance with
105 the Federation of European Laboratory Animal Science Association guidelines (FELASA).
106 Experiments were performed by FELASA accredited investigators (n° 311155580) and in
107 accordance with the local ethics committee, 'Science et Santé Animale' (SSA). All efforts
108 were made to minimize animal pain and distress.

109 **Cells and Bacteria**

110 **NFκB/AP-1 activity using reporter cell line**

111 The NFκB/AP-1 reporter RAW-Blue™ Cells (InvivoGen™) were cultured and propagated
112 according to the manufacturer's recommendations.

113 The NFκB/AP-1 was assessed as described in *Walachowski et al* [28]. RAW-Blue™
114 macrophages (1×10^5 cells/well) were stimulated with 100 μg/mL of BG preparations (BG15,
115 BG65, BG75, Curdlan, Zymosan, particulate and soluble WGP) for 8 h. Supernatants were
116 then removed and 100 ng/mL of ultraPure LPS was added in each well for the rest of the
117 stimulation period. Supernatants were collected and stored at -20°C or processed
118 immediately. SEAP was measured using a colorimetric enzymatic assay. Supernatants were
119 incubated with Quanti-Blue™ (InvivoGen) 25% v/v. for 2 h at 37°C, and optical density (OD
120 650nm) was measured (VERSAmax plate reader, Molecular Devices).

121 **Immortalized BMDM culture and functional assay**

122 WT and *MyD88*^{-/-} iBMDM were stimulated for 8 h with 100 μg/mL of *Sc* BG compounds
123 (BG15, BG65 and BG75) or controls (zymosan and dispersible WGPd) as described
124 elsewhere [28]. UltraPure LPS (100 and 10 ng/mL) was also included in the experiment as a
125 positive control of MyD88 activation. Supernatants were then removed and 100 ng/mL of
126 ultraPure LPS was added in each well for 16 h. Supernatants were collected and stored at -
127 20°C until further use.

128 **Bacteria**

129 *S. aureus* N305 and *E. coli* P4 strain were prepared as described previously by *Accarias et al*
130 [29] using grown medium adapted to each strain of bacteria (Tryptic Soy Broth (TSB) for
131 N305 and Lysogeny Broth (LB) for P4). Briefly, a 100-fold dilution of the overnight bacteria
132 culture was grown in medium to mid log phase to obtain an OD600 nm of around 1. After
133 cautious washing and homogenization, the concentration of bacteria was estimated by

134 measuring the absorbance at 600 nm (considering that 1 D.O. unit corresponds to 5×10^8
135 CFU/mL) and was adjusted to the desired concentration. CFUs were further determined in
136 serially diluted inoculum after 24 h of culture on agar plates.

137 **Primary cell culture and functional assays**

138 Murine BMDM were obtained as described previously [29]. Inflammatory peritoneal
139 macrophages were elicited and handled as previously described [28]. BMDM and TEPM
140 (1×10^5 cells/well) were seeded in 96-well tissue culture plates for 16 h in complete RPMI
141 until complete adherence (37°C , 5% CO_2). Non-adherent contaminating peritoneal cells were
142 eliminated by repeating three gentle washing of wells with pre-warmed culture medium or
143 PBS. After stimulation with *Sc* BG compounds or dectin-1 ligands controls for 8 h,
144 supernatants were removed and cells were then stimulated with 100 ng/mL of ultraPure LPS
145 or Pam3CSK4, or with live bacteria (*S. aureus* N305 or *E. coli* P4 strains, MOI = 10) for 1 h
146 followed by 16 h incubation with cell culture medium supplemented with Gentamicin™.
147 Supernatants were then collected, complete protease inhibitor cocktail (Roche, France) was
148 added in infected conditions and supernatants were finally stored at -20°C or -80°C until
149 further use.

150 **Quantification of cytokines and chemokines by ELISA**

151 $\text{TNF}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ (Biolegend, Ozyme-France) and GM-CSF (R&D Systems, France) levels in
152 culture supernatants were assayed using individual cytokine detection kits according to the
153 manufacturer's recommendations. Data are expressed as the mean \pm SD and are
154 representative of three individual experiments performed in triplicate.

155 **Microarray analysis**

156 After stimulation with *Sc* BG compounds and then with ultraPure LPS, BMDM were lysed in
157 RLT buffer and was subjected to RNA extraction using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden,

158 Germany) according to the manufacturer's instructions. RNA was quantified with a
159 NanoDrop®1000 spectrophotometer and NanoDrop 1000.3.7 software.

160 RNA quality assessment and microarray experiment was performed at the GeT-TRiX
161 platform (INRA, Toulouse, France). RNA quality was assessed using the Agilent RNA 6000
162 Nano Kit on BioAnalyzer and 2100 Expert Software (Agilent Technologies, Santa Clara,
163 USA). RNA samples with RNA integrity number more than 8.5 were chosen to be prepped
164 for further analysis. A total RNA material of 100 ng was amplified and labeled using a
165 Low Input QuickAmp Labeling kit (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). RNA were
166 hybridized to Agilent Sure Print G3 Mouse GE 8x60K microarrays, washed, stained and
167 scanned on an Agilent G2505C instrument following the manufacturers' protocols. Agilent
168 Feature Extraction software was used to analyze signal intensity values of the spots generated
169 from the scans. All data analysis were performed using R. Post-hybridization quality controls
170 were done to eliminate outliers and irrelevant data from the expression data set. Background
171 was subtracted and data was normalized using Bioconductor. All validated and normalized
172 transcripts expression data were processed using the Agilent GeneSpring GX software.

173 All entities with flag values present in at least 100% of the values in any one out of the six
174 conditions were considered. Statistical analysis (paired t-test) was used to generate a unique
175 list of up- or down-regulated entities with associated Benjamini Hochberg False Discovery
176 Rate corrected p-value and fold change (FC) and for hierarchical clustering. Transcripts with
177 detection p-value of less than or equal to 0.001 in at least one sample were selected for further
178 analysis. A filter was set to include only transcripts that had at least 1.5-fold change compared
179 to the LPS-stimulated cells without BG treatment control.

180 Using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software, a final list of unique identified genes (p-
181 value < 0.001 and absolute fold change ≥ 2) was generated after selection of mapped entities
182 and deduplication exercise on them, and which was then used to perform IPA bio-function

183 analysis. IPA categorized modulated genes according to p-values (calculated by the Fisher
184 exact test) and z-scores. The z-score predicts the direction of change of a function: a function
185 is increased when z-score is ≥ 2 and decreased when z-score ≤ -2 . IPA also calculated a bias-
186 corrected z-score to correct dataset bias (i.e. when there are more up- than down-regulated
187 genes in a bio-function or vice-versa).

188 **Gene expression by quantitative polymerase chain reaction**

189 **analysis**

190 Total RNA (300 ng) was reverse transcribed using the SuperScript III First-Strand Synthesis
191 Super Mix Kit (Invitrogen) as per the manufacturer's protocol. Quantitative PCR was
192 performed individually with Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and
193 LightCycler™ 480 (Roche, France) for *Csf2* and *Fhl2*; or with the Biomark HD System
194 (Fluidigm, France) at the GeT-PlaGe genotyping service platform (INRA, Toulouse, France)
195 according to the manufacturer's recommendations. For individual quantification, dissociation
196 curves analysis was performed at 40 cycles to verify the identity of PCR product. Primer3plus
197 software was used to design the primers (Table S1) and housekeeping genes were selected
198 with GeNorm Software. The abundance of mRNA of interest was normalized to that of *Sdha*,
199 *Rpl9* and *Hprt1* and relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. The
200 comparative threshold cycle values are expressed as arbitrary unit.

201 **Western Blot**

202 After 8 h of *Sc* CW extracts stimulation, WT BMDM were exposed to 100 ng/mL of ultraPure
203 LPS for 16 h. Supernatants were removed and cells were then lysed in RIPA lysis buffer
204 supplemented with 5mM EDTA and protease inhibitor (Pierce™, USA). Lysates were
205 centrifuged (14000 rpm, 10 min), pellets were discarded and proteins concentrations were
206 determined using BCA kit (Pierce™, USA). Following a 1:1 dilution in Laemmli buffer

Table S1: Primers designed for analysis of gene expression in BMDM by quantitative PCR.

Genes	Primers (5' -> 3')	
	Forward	Reverse
<i>Csf2</i>	CCGTAGACCCTGCTCGAATA	TGCCTGTACATTGAATGAA
<i>Fhl2</i>	TGCTTCTGTGACTTGTACGC	AAGCAGTCGTTGTGCCATTG
<i>Hbegf</i>	TGTCATCGTGGGACTTCTCATG	ACGCCCAACTTCACTTTCTC
<i>Inha</i>	ACGGCAAGGTCAACATTTGC	ATAGCCAGAGGGAGCAATGATC
<i>Car2</i>	ATAAAGCTGCGTCCAAGAGC	TTCAGCACTGCATTGTCCCTG
<i>Csf3</i>	CTGACAGTGACCAGGGGAAC	ATGGCTCAACTTTCTGCCAG
<i>Cish</i>	TACTGCAGTGCACCTGAAAC	TGATGACTAGCCGACACAGATG
<i>Osm</i>	AGACTCCGGCTTTTCCAAAG	GGGCCATGCAGAAAACATTG
<i>Dusp10</i>	GCCTACTTGATGAAGCACACAC	TTGGTTCGTTTGCCTTTGACG
<i>Socs2</i>	TCCAGATGTGCAAGGATAAACG	AGGTACAGGTGAACAGTCCCATT
<i>Itgb3</i>	ACGGATACTGGCAAAAACGC	ACTGGAATCTGACGACACAGTC
<i>Edn1</i>	ACATCATCTGGGTCAACACTCC	TTTTTGGTGAGCGCACTGAC
<i>Il1a</i>	AGATGACCTGCAGTCCATAACC	TGACAAACTTCTGCCTGACG
<i>Irf4</i>	AATGTCCTGTGACGTTTGGC	TGGGGCACAAGCATAAAAGG
<i>Ptgs2</i>	AGAACCTGCAGTTTGCTGTG	ATGTCGCACACTCTGTTGTG
<i>Il6</i>	GAGGATACCACTCCCAACAGACC	AAGTGCATCATCGTTGTTTCATACA
<i>Il23a</i>	TGTGCCCCGTATCCAGTGT	CGGATCCTTTGCAAGCAGAA
<i>Ccl2</i>	CTTCTGGGCCTGCTGTTCA	CCAGCCTACTCATTGGGATCA
<i>Il1b</i>	CAACCAACAAGTGATATTCTCCATG	GATCCACACTCTCCAGCTGCA
<i>Il10</i>	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT
<i>Tnfa</i>	CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA	TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC
<i>Ccl24</i>	TGTGGGTTTCAGAGGCACATAC	ACTTGGTTCTCACTGCCTTG
<i>Mrc1</i>	ATGCCAAGTGGGAAAATCTG	TGTAGCAGTGGCCTGCATAG
<i>Cx3cr1</i>	TGCCCTTGCTTATCATGAGC	TGGCCTTCTTGCATTCTTG
<i>Ch25h</i>	ACAAAATGCTGGGCACTCTG	ATCAAGGTACAGCGCATCG
<i>Nos2</i>	ACATCCTGCAAAAAGCAGCTG	AGCTTCTTCAACGTGGTAGC
<i>Sdha</i>	ATTGTGCCTGGTCTGTATGC	AATTTGCTCCAAGCCGGTTG
<i>Rpl9</i>	TGGTCCCTGCTCTCAAG	GGCCTTTTCTTCCGTTTCTC
<i>Hprt1</i>	AGGACTGAAAGACTTGCTCGAG	AATCCAGCAGGTGAGCAAAAG

207 (Biorad, CA, USA), ten micrograms of total protein was separated on NuPAGE® 4-12% Bis-
208 Tris Mini gels (1.0 mm, 12 wells, Invitrogen™) and blotted onto nitrocellulose membrane
209 (0.2 µm, Invitrogen™) using the XCell SureLock™ Mini gel system (Invitrogen™, USA).
210 After blocking with 1% BSA and 0.05% Tween 20 (Sigma-Aldrich®, USA) in Tris-Buffer
211 Saline (TBS, Euromedex, France), the membrane was stained with primary anti-FHL2 (F4B2-
212 B11) and anti-βactin (C4) as loading control mAbs (Santa Cruz Biotechnologies, Germany) at
213 4°C, overnight. The membrane was then washed in TBS with 0.05% Tween 20 and incubated
214 with goat anti-mouse antibodies conjugated with horseradish peroxidase (Jackson
215 ImmunoResearch, PA, USA) for 1 h at room temperature. Signals were detected with
216 Clarity™ Western ECL substrate and the ChemiDoc™ MP instrument according to the
217 manufacturer's instructions (Biorad, CA, USA). Image Lab software was used for minor
218 linear adjustments in contrast, if needed.

219 **Statistical analysis**

220 All experiments were performed three times unless otherwise specified and data are expressed
221 as the mean ± SD of the values from all experiments. Each condition was performed in
222 triplicate. Statistical significance was assessed using a two-tailed unpaired *Student's t-test*
223 with a threshold set at $p < 0.05$. Mean values shown with different letters on plots are
224 significantly different.

225

226 **Results**

227 **BG-enriched compounds trigger a synergistic dectin-1-dependent** 228 **response in macrophages upon TLR ligands or whole bacteria** 229 **exposure.**

230 We first investigated the effects of a pretreatment with BG-enriched compounds, on the
231 responsiveness of two types of primary murine macrophages, BMDM and TEPM. Several
232 types of stimuli were included whether TLR ligands or live bacteria, to cover a large array of
233 signaling pathways. As shown in Fig 1A, 16 h of LPS or Pam3CSK4 (100 ng/mL) stimulation
234 on BMDM pretreated with enriched BG for 8 hours significantly enhanced TNF α production
235 as compared to cells stimulated with crude extract (BG15) or mock condition. Furthermore,
236 when a more complex combination of PAMPs was assessed using whole living bacteria, the
237 cytokine production was three to eight times higher, indicating that a synergy was effective
238 with at least TLR2 and TLR4 signals, and probably a more diverse array of receptor signaling.
239 To determine whether such interplay involved dectin-1, we repeated the same experiment
240 using *Clec7a*^{-/-} cells (Fig 1B). Strikingly, whereas dectin-1-deficiency did not alter the cell
241 response following pretreatment with the crude *Sc* extract BG15 upon stimulation with all
242 types of ligands, we consistently observed that absence of dectin-1 on BMDM severely
243 undermined the synergistic response by more than 50%. These data suggest that the
244 production of TNF α , promoted by BG-enriched particles followed by TLR stimulation is
245 largely mediated by the dectin-1 pathway. Furthermore, we used BMDM from DBA/2 mouse
246 strain, which expresses a more active isoform of the dectin-1 receptor on the cell surface
247 compared to C57Bl/6 strain. This experiment revealed a more pronounced synergistic TNF α
248 production (Fig S1A), which reinforced the point that dectin-1, is foremost cue entailing the

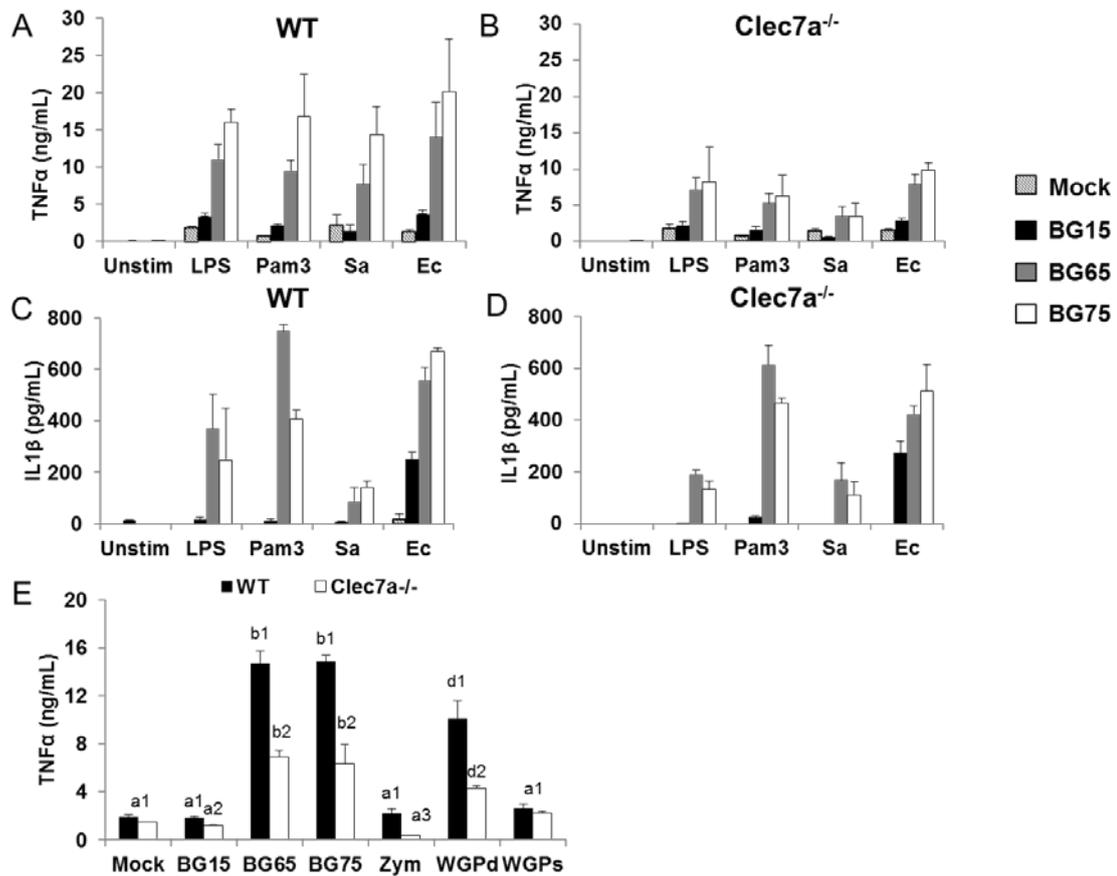


Figure 1 *Walachowski et al*

FIGURE 1. Enriched *Sc* BG trigger a synergistic response predominantly driven by dectin-1 in macrophages upon TLR ligands or whole bacteria exposure.

Wild type (A-C) or *Clec7a^{-/-}* (B-D) BMDM or TEPM (E) were stimulated with 100 µg/mL of BG-enriched *Sc* compounds for 8 h. After incubation, cell culture supernatants were removed and cells were stimulated with 100 ng/ml of Pam3CSK4 or ultraPure LPS for 16 h. For the stimulation with live bacteria *S. aureus* N305 or *E. coli* P4 strains were used at MOI=10 for 1 h, followed by 16 h incubation with cell culture medium supplemented with Gentamicin™. At the end of the incubation, supernatants were collected and immediately stored at -20°C. Proinflammatory cytokines TNFα and IL1β were quantified by ELISA. Data are expressed as the mean ± SD from three independent experiments performed in triplicate. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the *Student's t-test* ($p < 0.05$).

249 promoted response after successive BG and TLR stimulation in genetic backgrounds with a
250 difference of dectin-1 structure.

251 As the BG-dectin-1 interaction was previously reported to signal via the inflammasome
252 pathway, we also quantified the active form of IL-1 β in the same culture supernatants. BG-
253 enriched extracts triggered a strong and consistent synergistic response whatever the stimulus
254 in WT BMDM (Fig 1C). Furthermore, crude *Sc* extract BG15 did not induce a significant
255 increase of the IL-1 β cytokine production, since it did not differ from the mock condition.
256 Surprisingly, dectin-1-deficiency did not affect amplification of the response as the IL-1 β
257 production was the same in the two backgrounds (Fig 1C and D). However, the BG
258 pretreatment was more efficient on IL-1 β production in the DBA/2 strain, despite a lower
259 basal production in this strain compared to C57Bl/6 (Fig S1B).

260 To ensure that the BG treatment effect was not particular to BMDM, we also measured the
261 response in thioglycollate-elicited peritoneal macrophages (TEPM). TEPM from WT and
262 *Clec7a*^{-/-} mice were pre-treated in the same conditions as described above. We confirmed that
263 BG-pretreated WT macrophages produced significantly higher amounts of TNF α than BG15-,
264 zymosan- and also WGPs-pretreated cells (14 ng/mL with BG65 and BG75 versus 2 ng/mL
265 with BG15) (Fig 1E), and dectin-1-deficiency led to the same reduction of cytokine
266 production as presented above. These data confirm the compelling involvement of dectin-1 in
267 the synergistic cytokine production triggered by BG-enriched treatment before stimulation
268 with LPS in at least two different macrophage types and genetic backgrounds (Fig S1C).

269 Altogether, these data show that BG-enriched compounds induce a strong and synergistic
270 TNF α and IL-1 β production in BMDM upon TLR or live bacteria stimulation, partly through
271 the dectin-1 pathway.

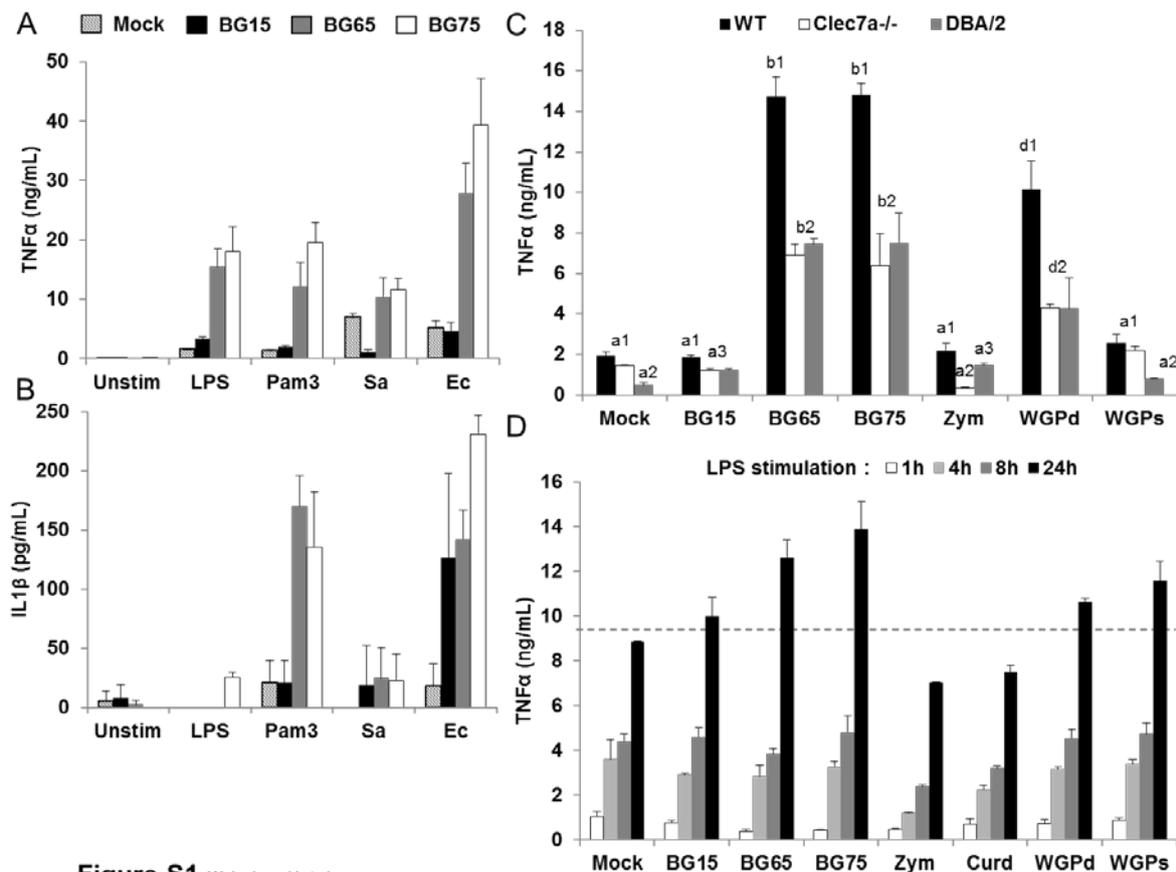


Figure S1 Walachowski et al

FIGURE S1. Effect of *Sc* BG compounds on cytokine expression is dependent on the mouse genetic background.

(A-B) BMDM or TEPM (C) from DBA/2 mice (or WT or *dectin1*^{-/-} C57Bl/6) were stimulated with 100 μg/mL of BG-containing *Sc* CW compounds for 8 h. After incubation, cell culture supernatants were removed and cells were then stimulated as described in Fig 2. At the end of the incubation, supernatants were collected and immediately stored at -20°C. TNFα and IL1β were quantified using ELISA. (D) NFκB/AP-1 reporter RAW-Blue™ macrophages were treated with 100 μg/mL of BG-containing *Sc* CW compounds (BG15, BG65 and BG75) or controls (zymosan, curdlan, dispersible (d) and soluble (s) WGP) for 8 h before stimulation with 100 ng/mL of ultraPure LPS for 1, 4, 8 or 24 h. At the end of the incubation, supernatants were harvested and stored at -20°C until further use. TNFα was quantified by ELISA. Data are expressed as the mean ± SD from three independent experiments performed in triplicate. The dotted line is set as the value of the LPS stimulation only condition. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the *Student's t-test* ($p < 0.05$).

272 **The synergistic response is a late and dose-dependent mechanism**
273 **and requires signaling through MyD88.**

274 To precisely define the occurrence conditions of the synergistic response, we evaluated the
275 dose- and time-effects of the BG-priming on promotion of the cytokine production. First, we
276 investigated whether the BG concentration influences the synergistic effects using LPS as an
277 archetypic stimulus. Amplification of TNF α response mediated by BG-enriched extracts was
278 only detected for BG concentration higher than 30 μ g/mL (Fig 2A). We next assessed the
279 time-effect in the *Sc* BG priming model. BMDM were incubated with *Sc* BG compounds for
280 1, 4, 8 or 16 h and then with ultraPure LPS for 16 h, or co-incubated with both *Sc* BG
281 compounds and LPS just before supernatant harvest. The synergistic effect prominently
282 appeared from 8 h of pre-treatment and was significantly enhanced after 16 h of incubation,
283 while shorter incubation time or co-stimulation with *Sc* BG-enriched extracts induced
284 amounts of TNF α production similar to those triggered by crude BG15 (Fig 2B). Furthermore,
285 while cytokine production induced by crude BG15 peaked after 8 h of incubation and was
286 decreased at 16 h, the synergized response was still high after 16 h of incubation. BG-
287 enriched pretreatment in BMDM leads to an increased amount of TNF α secretion occurring
288 through a mechanism that develops lately, suggesting that *de novo* protein synthesis might be
289 required. Experiments comparing WT and *MyD88*^{-/-} iBMDM cells were carried out to verify
290 that the cytokine production was solely induced upon MyD88-dependent TLR engagement
291 and amplified by the Dectin-1 primary signal. Indeed, TNF α production in response to BG65
292 or BG75 pre-treatment was also highly amplified after LPS exposure as compared to BG15
293 and WGPd priming conditions in WT BMDM cell line (Fig 2C), and the stimulus effect was
294 lost in the absence of MyD88. Moreover, when cells were pre-treated with LPS (at high and
295 low concentrations), a severe weakening of the TNF α release was observed as compared to
296 the mock condition, indicating that BMDM are unable to respond to a second stimuli when

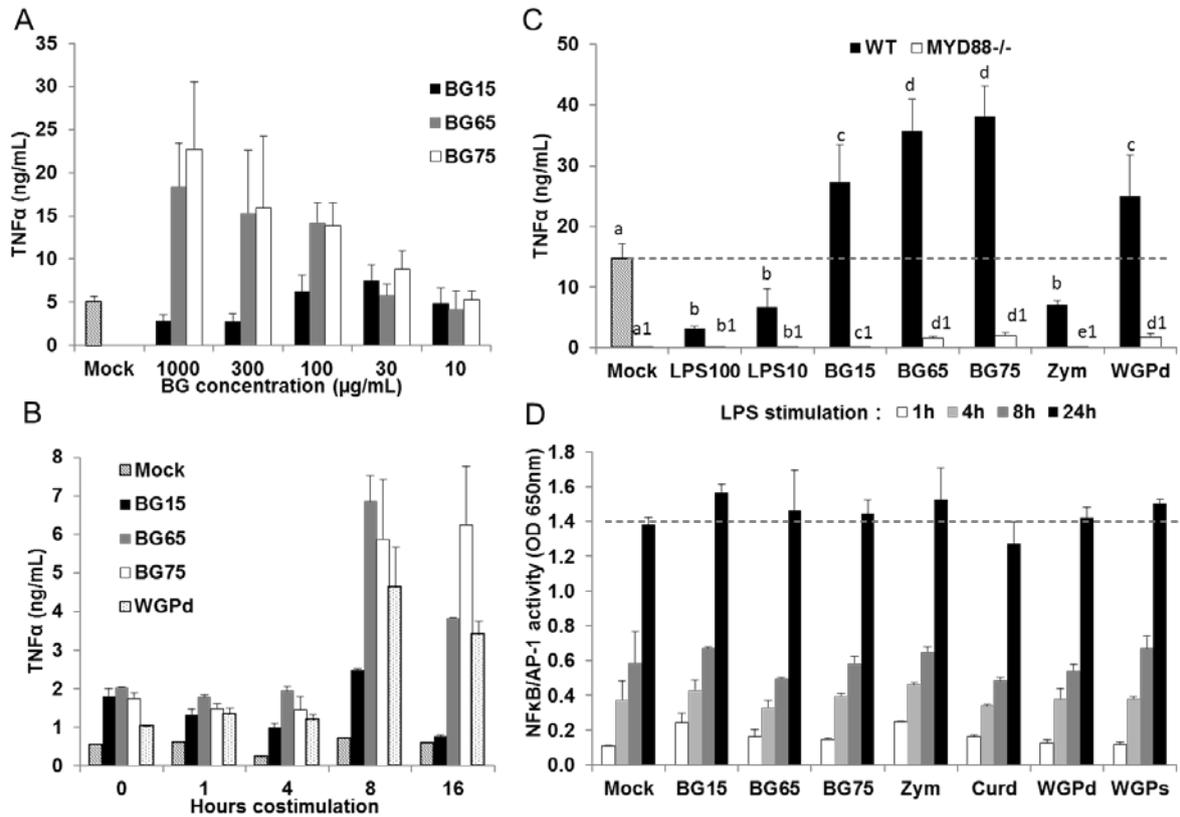


Figure 2 *Walachowski et al*

FIGURE 2. The synergistic response is BG dose-dependent and requires MyD88 signaling.

(A-B) BMDM from C57Bl/6 mice were subcultured in 96-well plates. **(A)** Cells were incubated for 8 h with a 3-fold serial dilution from 1000 to 10 $\mu\text{g/mL}$ of the set of *Sc* BG compounds (BG15, BG65 and BG75). After supernatant removal, BMDM were then stimulated with 100 ng/mL of ultraPure LPS for 16 h. Supernatants were collected at the end of the incubation for further analysis. **(B)** Cells were stimulated for 1, 4, 8, 16 and 24 h with 100 $\mu\text{g/mL}$ of BG-containing *Sc* CW extracts (BG15, BG65 and BG75) or control (WGPd). Supernatants were discarded and 100 ng/mL of ultraPure LPS was added in each well for 16 h incubation. Supernatants were immediately collected and stored at -20°C . TNF α was measured using ELISA and data are expressed as the mean \pm SD from two independent experiments performed in triplicate. **(C)** Immortalized BMDM (iBMDM) from WT or *MyD88*^{-/-} mice were subcultured in 96-well plates and stimulated for 8 h with 100 $\mu\text{g/mL}$ of BG-containing *Sc* extracts (BG15, BG65 and BG75), controls (zymosan and WGPd) and LPS at 100 or 10 ng/mL. Supernatants were removed and cells were then incubated with 100 ng/mL of ultraPure LPS for additional 16 h. Supernatants were harvested at the end of the incubation time for TNF α quantitation by ELISA. Data are expressed as the mean \pm SD from two independent experiments performed in duplicate. **(D)** NF κ B/AP-1

reporter RAW-Blue™ macrophages were treated with 100 µg/mL of BG-containing *Sc* CW compounds (BG15, BG65 and BG75) or controls (zymosan, curdlan, dispersible (d) and soluble (s) WGP) for 8 h before stimulation with 100 ng/mL of ultraPure LPS for 1, 4, 8 or 24 h. At the end of the incubation, supernatants were harvested and stored at -20°C until further use. NFκB activity was determined by a colorimetric enzyme assay where cell culture supernatants were incubated with Quanti-Blue™ reagent before reading OD at 650nm. Data are expressed as the mean ± SD from three independent experiments performed in triplicate. The dotted line is set as the value of the LPS stimulation only condition. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the *Student's t-test* ($p < 0.05$).

297 the first signal elicits a strong inflammatory response, a phenomenon known as LPS tolerance.
298 RAW-Blue™ macrophages were used to assess NFκB/AP-1 activities, associated to the
299 production of TNFα. Effects on this cell line were consistent with those described above (Fig
300 S1D). Although NFκB/AP-1 activities were correlated with the amount of secreted TNFα and
301 duration of the BG pretreatment (Fig 2D), no difference was detected in the NFκB/AP-1
302 activities, indicating that the synergy does not result from heightened NFκB/AP-1 signaling.

303 **BG pre-treatment induces upregulation of genes involved in the**
304 **macrophage inflammatory response and bacteria clearance after**
305 **LPS exposure.**

306 Gene expression profiling was performed in BMDM pretreated with BG15, BG65 and BG75,
307 or mock conditions for 8 h, and stimulated with LPS for 4 or 8 h. Using a 2-way ANOVA
308 with a false discovery rate of 0.001 and a fold expression difference of at least 1.5, we
309 identified a total of 2268, 787 and 670 at 4 h and 1627, 935 and 664 differentially-expressed
310 genes (DEG) at 8 h in the comparison between BG15, BG65 and BG75, and mock conditions,
311 respectively. Approximately the same number of up- and down-regulated genes was detected,
312 and BG15 induced significantly more DEG than the enriched BG65 and BG75 extracts after
313 LPS stimulation (Fig 3A). Based on a fold difference above 5, DEG were organized by
314 hierarchical clustering (Euclidian distance) according to similarities in the expression profiles.
315 Conditions with BG65 and BG75 clustered together in contrast to BG15 and mock conditions
316 whatever the time of harvest upon LPS stimulation (Fig 3B). The discrimination between BG-
317 enriched, crude compounds and mock condition was consistent with what was revealed by the
318 PCA analysis (data not shown). Two gene clusters (purple in the entities dendrogram) were
319 commonly modulated by BG65 and BG75. A subset of these genes with the highest FC
320 between BG65/75 and BG15/mock conditions whatever the time point is presented in Table 1.

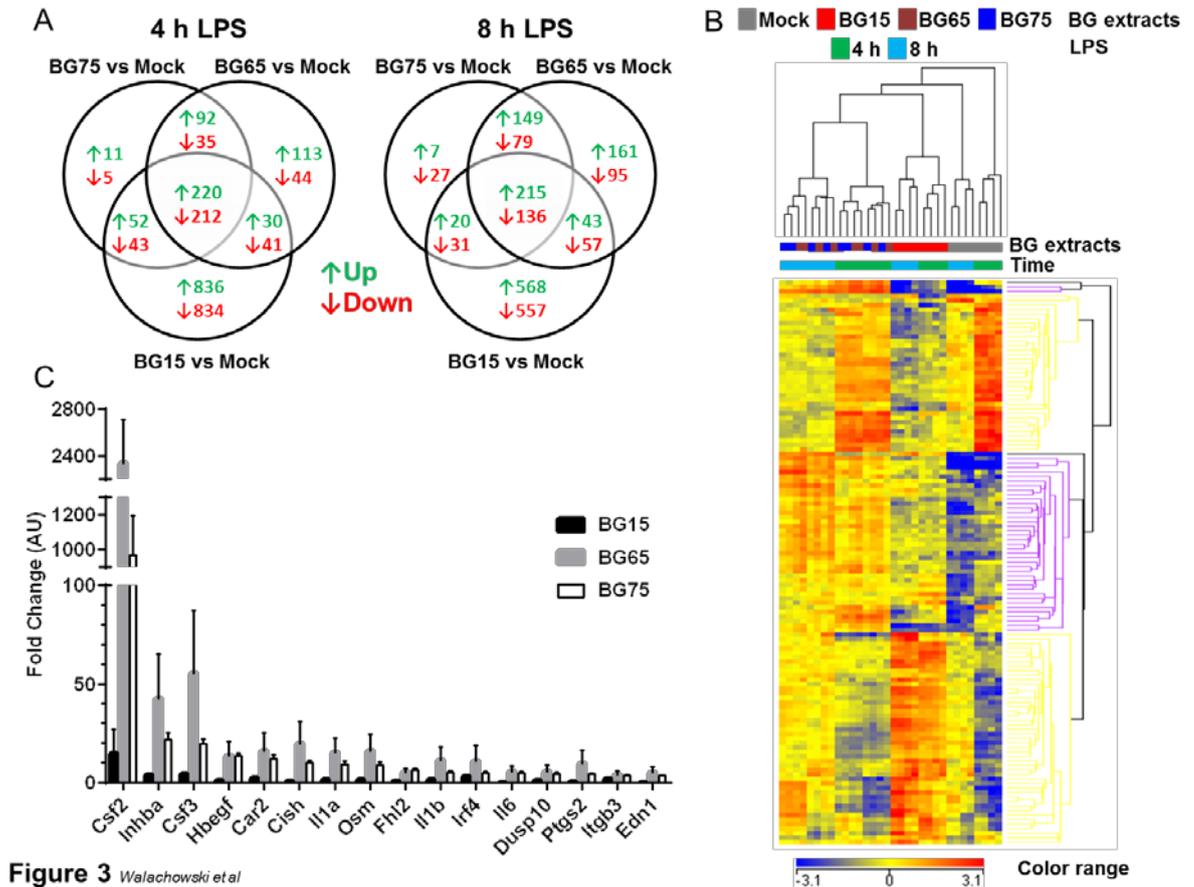


Figure 3 *Walachowski et al*

FIGURE 3. Gene expression profiling of BG-enriched treated macrophages reveals enrichment for inflammatory response after LPS exposure.

WT BMDM from C57Bl/6 mice were cultured in 24-well plates and treated with 100 μ g/mL of the set of three BG extracts for 8 h in triplicate. After incubation, supernatants were removed and cells were stimulated with 100 ng/mL of ultraPure LPS for 4 or 8 h. A microarray analysis was performed using Agilent mRNA transcriptomic analysis. After quality control and normalization, data were analyzed using Agilent GeneSpring GX software and transcripts with a fold change of at least 1.5 between conditions and a p-value of less than or equal to 0.001 in at least one sample were selected for further analysis. Differences between results were evaluated by 2-way ANOVA and Benjamini-Hochberg post-hoc correction. **(A)** Venn diagrams showing the overlap of upregulated (\uparrow) and downregulated (\downarrow) genes in each condition were obtained using VENNY 2.0. **(B)** Unsupervised hierarchical clustering (Euclidian distance) of transcriptional profiles, displayed as a heatmap of fold-change expression values, from *Sc* BG-treated BMDM compared to non-treated BMDM upon LPS exposure. Each row represents a transcript and each column an individual sample. The heatmap shows 3 main clusters constituted by

entities for which fold change were greater than 5 with a p-value of 0.001 compared to mock plus 8 h LPS-stimulated cells. Red indicates over-expressed and blue indicated under-expressed transcripts. (C) A sample of the top up-regulated genes in the different BG conditions BG15-, BG65- or BG75-treated BMDM versus the mock control after 8 h of LPS exposure based on the transcriptomic results ($FC > 1.5$, $p\text{-value} < 0.001$) is given. Gene expression was confirmed by RT qPCR and normalization was performed with three housekeeping genes (*Sdha*, *Rpl9* and *Hprt1*). Data are expressed as the mean \pm SD from 3 independent mice. Comparisons are shown for each BG condition against mock and each mean values from BG65 and BG75 are significantly different from BG15 mean values according to the unpaired two-tailed *Student's t-test* ($p < 0.05$).

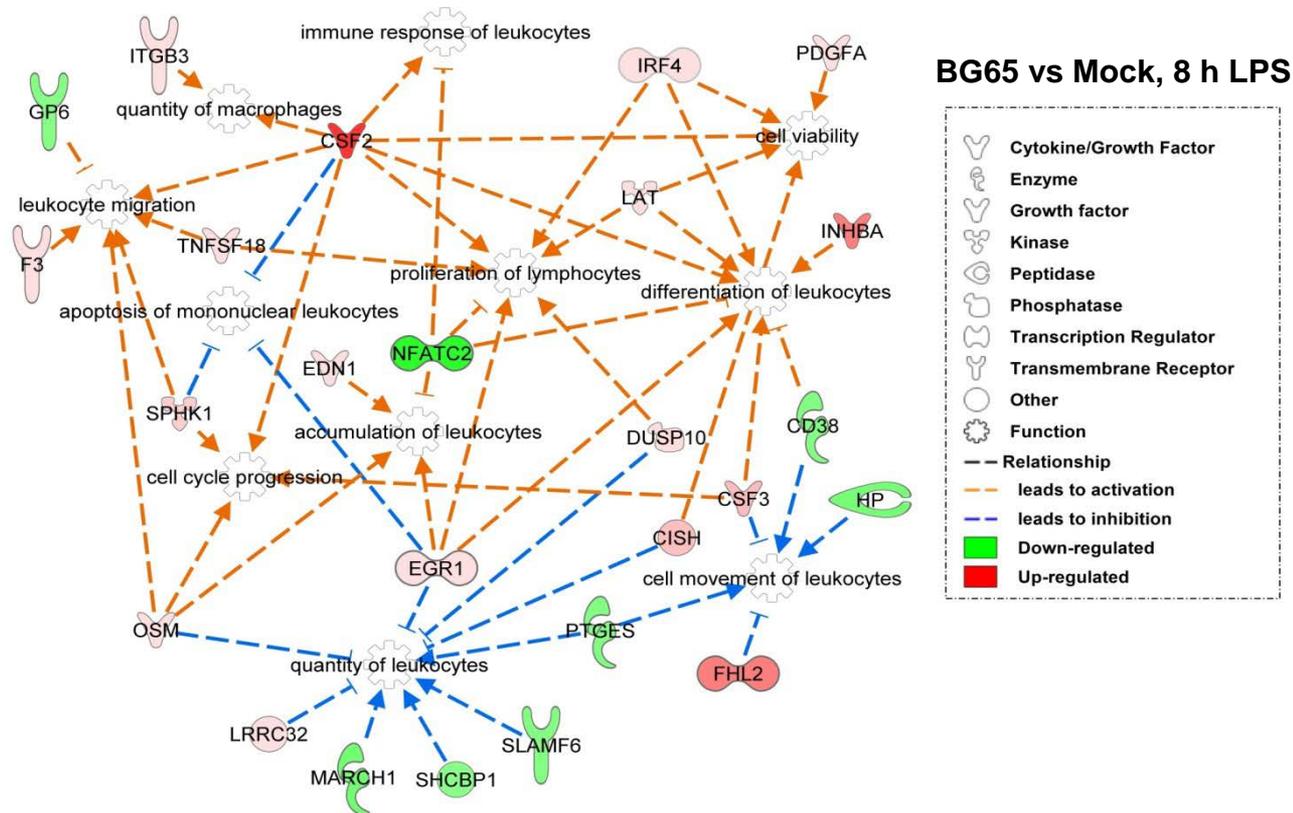
Table 1: A sample of the most differentially expressed genes after BG treatment upon LPS exposure

↑Up-regulated			4 h LPS			8 h LPS		
Rank	Gene	Gene Title	BG15	BG65	BG75	BG15	BG65	BG75
1	<i>Csf2</i>	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	1.8	20.3	14.0	4.2	64.9	43.1
2	<i>Fhl2</i>	Four and a half LIM domains 2	2.4	43.3	31.1	1.7	41.0	35.7
3	<i>Hbegf</i>	Heparin-binding EGF-like growth factor	2.8	11.3	8.3	6.0	46.0	32.6
4	<i>Inhba</i>	Inhibin beta-A	16.3	20.1	15.3	20.9	41.0	29.9
5	<i>Car2</i>	Carbonic anhydrase II	10.9	29.2	19.6	9.8	36.9	27.2
6	<i>Dok7</i>	Docking protein 7	9.4	19.6	13.1	11.8	34.0	22.9
7	<i>Csf3</i>	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	32.1	11.4	12.7	15.2	21.2	19.2
8	<i>Cish</i>	Cytokine inducible SH2-containing protein	-2.9	3.0	2.1	1.5	19.8	13.0
9	<i>F3</i>	Coagulation factor III	1.8	5.6	4.8	2.1	13.1	11.4
10	<i>Vasn</i>	Vasorin	1.6	4.5	3.3	3.2	13.3	10.8

↓Down-regulated			4 h LPS			8 h LPS		
Rank	Gene	Gene Title	BG15	BG65	BG75	BG15	BG65	BG75
1	<i>Cx3cr1</i>	Chemokine (C-X3-C) receptor 1	-2.6	-2.6	-2.1	-6.8	-5.8	-3.9
2	<i>Pcp4l1</i>	Purkinje cell protein 4-like 1	-9.7	-2.4	-2.6	-10.2	-2.8	-3.1
3	<i>Ccl24</i>	Chemokine (C-C motif) ligand 24	-3.6	-2.5	-2.6	-4.7	-3.0	-3.0
4	<i>Slc9a9</i>	Solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9	-3.5	-2.5	-2.4	-2.8	-1.9	-3.0
5	<i>Net1</i>	Neuroepithelial cell transforming gene 1	-1.9	-1.2	-1.2	-4.3	-2.8	-2.8
6	<i>Ramp1</i>	Receptor (calcitonin) activity modifying protein 1	-3.2	-2.4	-2.5	-3.1	-2.5	-2.7
7	<i>Tmem114</i>	Transmembrane protein 114 (Cldn26)	1.0	1.6	1.3	-3.0	-2.7	-2.6
8	<i>Nudt17</i>	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 17	-4.2	-3.4	-2.7	-3.6	-1.9	-2.6
9	<i>Stab2</i>	Stabilin 2	-6.1	-2.4	-2.4	-2.7	-1.5	-2.5
10	<i>Acat3</i>	Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 3	-2.4	-2.5	-2.3	-3.0	-2.9	-2.4

321 Amongst these genes, *Csf2*, *Fhl2* and *Cish* clustered together as they were upregulated by 20
322 to 60-fold in BG65/75 at 8 h time point, whereas these genes were not expressed in BG15 or
323 mock conditions (Table 1). In the second purple cluster (Fig 3B), 40 genes were revealed to
324 exhibit a similar pattern of expression following treatment with BG65/75. This cluster was
325 functionally enriched for genes involved in the inflammatory response (15 entities), cellular
326 movement (15 genes), cell growth and proliferation (18 entities) and also in cell cycle (5
327 entities) and molecular transport (15 entities). A pathway analysis showed that these genes
328 were strongly implicated in the acute phase response, in macropinocytosis and IL-10 signaling
329 as well as atherosclerosis signaling with TP53, CREB1 and STAT3, as the main upstream
330 regulators. *Csf3* was also present in the second purple cluster (Fig 3B), and confirmed by fold
331 changes in Table 1. Functional analysis of the 44 genes from the purple clusters was done
332 with DAVID [30], that revealed significant KEGG pathways including JAK-STAT signaling
333 pathway, cytokine-cytokine receptor interactions, hematopoietic cell lineage and MAPK
334 signaling pathway, and also phospholipids as signaling intermediaries pathway (Biocarta). In
335 this analysis, we also found consistent enrichment for immune (GO:0006955), inflammatory
336 (GO:0006954) and defense response (GO:0006952, BP00148), response to wounding
337 (GO:0009611), positive regulation of cell proliferation and differentiation (GO:0008284;
338 BP00224), and cell communication (BP00274). We next identified molecular mechanisms
339 associated-functions, which were ligand-mediated signaling (BP00122), signal transduction
340 (BP00102) and intracellular signaling cascade (GO:0007242; BP00111), including JAK-
341 STAT cascade (BP00117) leading to regulation of phosphorylation (GO:0042325), positive
342 regulation of gene expression (GO:0010628) and cytokine activity (GO:0005125; MF00017)
343 or signaling molecule synthesis (MF00016). As shown in Fig S2A, an analysis of the immune
344 cell functions performed using IPA software confirmed that the most upregulated genes

A



B

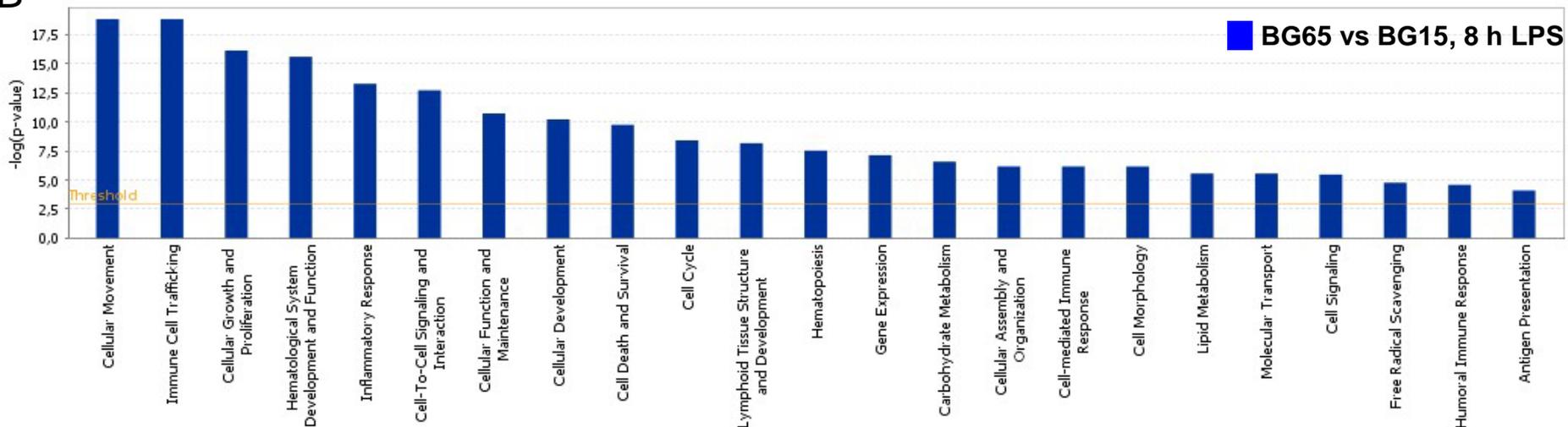


Figure S2 Walachowski et al

FIGURE S2. BG-enriched primed macrophages exhibit enrichment for strong inflammatory response and cell viability after LPS exposure.

WT BMDM from C57Bl/6 mice were handled according to the same procedure as described in Fig 3. After BG pretreatment for 8 h, cells were stimulated with 100 ng/mL of ultraPure LPS for 4 or 8 h. Total RNA was extracted and transcriptomic analysis was performed using Agilent microarrays and GeneSpring software. **(A)** Using heatmap (presented in Fig 3) of fold-change expression values, from *Sc* BG-treated BMDM compared to non-treated BMDM upon LPS exposure, we performed an analysis of functions enriched by the genes upregulated by BG-enriched priming (purple clusters: FC > 5 and p-value < 0.001) with the Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software. The results are shown as a network of significant functions associated with the main upregulated genes according to p-values (calculated by the Fisher exact test) and z-scores. **(B)** Based on a comparison of fold change expression values between BG-enriched and BG15 priming upon 8 h of LPS exposure obtained from GeneSpring software (FC > 1.5), we performed a function analysis using IPA. Significant functions which p-values (calculated by the Fisher exact test) were lower than 0.001 are displayed (threshold value = 4).

345 induced by BG-enriched treatment contributed to the enrichment of recruitment and activation
346 of leukocytes, but also improved cell viability and lymphocyte proliferation.

347 In the two yellow clusters were genes specifically modulated by crude *Sc* BG15. The first
348 yellow cluster identified in the upper part of the Fig 3B is constituted by 35 genes which were
349 early and consistently overexpressed in mock condition and to a lesser extent in BG-enriched
350 conditions following 4 h of LPS stimulation, but downregulated in BG15 condition. These
351 genes were processed using IPA software and were involved in cyclins and cell cycle
352 regulation (p-value = 0.008) and in prostanoid biosynthesis pathways (p-value = 0.03). The
353 identified associated-functions were lipid metabolism, cell cycle and cellular development and
354 maintenance with the transcription factors RB1, FOXM1 and E2F directly involved, which
355 are essential for cell cycle regulation and control, but also for tumor suppressor mechanisms.

356 DAVID analysis performed on these genes confirmed enrichment for cell proliferation,
357 including mitosis (GO:0007067), M-phase (GO:0000279; GO:0000087), nuclear and cell
358 division (GO:0000280, GO:0051301), cell cycle phase and process (GO:0022403,
359 GO:0022402), DNA replication (GO:0006260) or cytokinesis (GO:0000910). In this cluster,
360 genes were significantly enriched for immune cell recruitment as leucocyte migration
361 (GO:0050900), cell motility and migration (GO:0048870, GO:001647), macrophage
362 chemotaxis (GO:0048246) but also for their roles in immune response (cytokine-mediated
363 signaling pathway, GO:0019221) as shown by the cytokine-cytokine receptor interaction
364 identified by KEGG pathway (mmu04060). Interestingly, a trend was identified for
365 enrichment of the negative regulation of cell death and apoptosis (GO:0043066, GO:0060548)
366 in this cluster, suggesting that BG15-stimulated-macrophages were not able to activate those
367 genes involved in cell recruitment and survival at early stage of the inflammatory response,
368 which is consistent with our previous observations.

369 The second yellow cluster (47 genes) possesses genes that are significantly and exclusively
370 elevated by BG15 after 8 h of LPS exposure (and to a lesser extent at 4 h), whereas slight
371 down-regulation or lower expression changes were identified in BG-enriched and mock
372 conditions. Using IPA software, relevant canonical pathways were acute phase response
373 signaling (p-value = 0.0004), IL-17 and IL-10 signaling (p-value = 0.009 and 0.01), and
374 communication between innate and adaptive immune cells (p-value = 0.01) for instance. This
375 analysis also targeted cell functions as inflammatory response, cellular movement, function
376 and maintenance, cell death and survival and cell-to-cell signaling and interaction and cell
377 trafficking. STAT1 (bacterial immune response), STAT3 (cellular growth) and STAT6
378 (adaptive immune response) were identified as the main upstream regulators affected, as well
379 as CEBPB (inflammatory response) and NOTCH1 (cell proliferation and apoptotic programs).
380 In this cluster, we confirmed primarily enrichment for immune and inflammatory response
381 (GO:0006955, GO:0006954), for defense (BP00148) and response to wounding
382 (GO:0009611); but also for cytokine and chemokine mediated signaling pathway and
383 immunity (BP00107, BP00255) associated to a ligand-mediating signal (BP00122) leading to
384 molecular mechanisms implying immunoglobulin receptor family members (MF00004) and
385 interleukins (MF00232). Thus, from these analyses, we conclude that BG-enriched-pretreated
386 macrophages, have the biosynthetic machinery for inflammatory response and cell to cell
387 trafficking, including cytokine production and ligand-mediated signaling via JAK-STAT and
388 MAPK pathways, as well as chemoattraction, antigen presentation fostering T-cells priming
389 and cell survival upon stimulation with LPS. In another hand, BG15- (or mock-) pretreated
390 macrophages upregulated genes responsible for acute inflammatory and defense response, and
391 cell communication using cytokine interactions between innate and adaptive immune cells.
392 However, in mock condition, macrophages early exhibited enrichment for cell proliferation as
393 shown by the activation of cell cycle processes and the leucocyte migration enrichment,

394 which remained a transient and low intensity immune response in contrast to the BG-
395 enriched-triggered response. As well, in BG15 condition, the inflammatory response was
396 delayed but remained transient and lower, as suggested by activation of *Arg1* or *Il19*, *Il10* and
397 *Il23r* (linked to *STAT3*), associated to apoptosis and inhibition of inflammation in
398 macrophages. This was also confirmed by the IPA analysis performed on the functions
399 improved by BG-enriched pretreatment compared to BG15 with fold change greater than 2
400 and p-value < 0.001. All the functions involved in inflammatory response machinery (FOS,
401 CREM, EGR1, TP53) were over represented in BG-enriched conditions (previously listed), as
402 well as an anti-apoptotic survival signal (CREB1) (Fig S2B), meaning that BG-enriched
403 pretreatment induces a more consistent and robust macrophage activation after LPS exposure.
404 The functions associated with the down-regulated genes in BG conditions compared to mock
405 indicated an inhibition of the superpathway of cholesterol biosynthesis (p-value = 1.79E-9)
406 which targeted lipid metabolism involved in cellular organization and cell to cell signaling
407 and interaction.

408 **Validation of microarray results at transcriptional and protein** 409 **levels.**

410 Microarray results were confirmed using measurement by RT-qPCR on a different set of
411 samples. Normalization between samples and conditions was done with *Sdha*, *Rpl9* and *Hprt1*
412 that were firstly determined as stably expressed in our experimental conditions. qPCR results
413 were strongly correlated with the microarray results for all the genes that were evaluated (n =
414 26 genes), with a Pearson's correlation coefficient of 0.57 (p-value < 0.001), and largely
415 confirmed microarray results (Fig 3C, Fig 4A, Fig 5A). We next examined protein expression
416 of the most differentially-expressed genes between BG65/75 and mock/BG15 conditions. The
417 production of GM-CSF was significantly increased as a function of the purity levels of BG
418 compounds used for treatment (Fig 4B). Whereas GM-CSF production was low (around 50

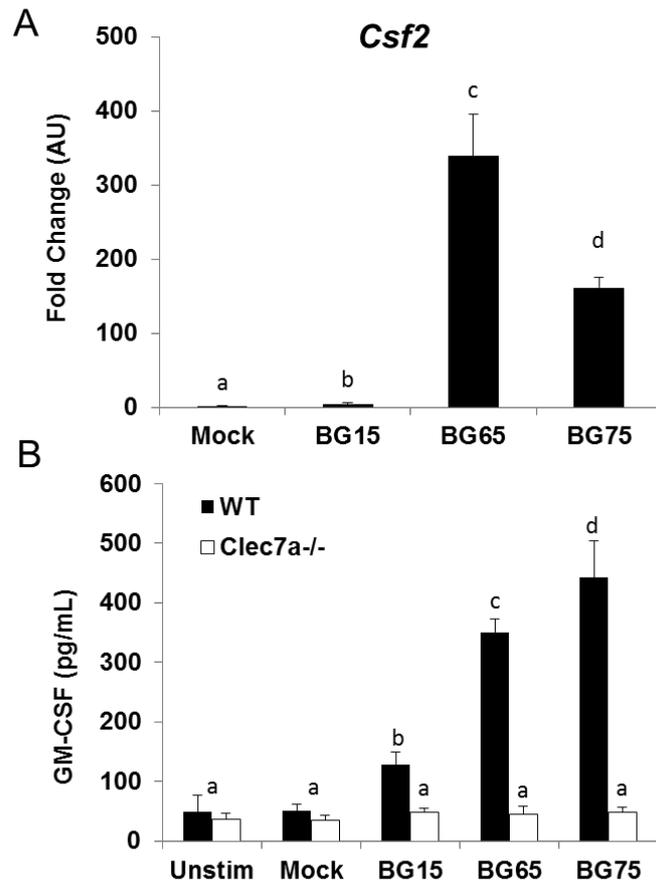


Figure 4 *Walachowski et al*

FIGURE 4. *Csf2* upregulation induced by BG-enriched *Sc* CW compounds treatment and LPS exposure is mainly dectin-1-dependent.

WT or *Clec7a*^{-/-} BMDM were stimulated with 100 μ g/mL of crude (BG15) or enriched (BG65, BG75) *Sc* CW extracts for 8 h. After incubation, cell culture supernatants were removed and 100 ng/mL of ultraPure LPS or medium was added in each well for 8 (A) or 48 h (B). (A) Supernatants were discarded and BMDM were lysed in RLT lysis buffer. Total RNA was extracted as described before and retro-transcribed. *Csf2* expression was determined by quantitative PCR after normalization with three housekeeping genes (*Sdha*, *Rpl9* and *Hprt1*). Fold change data are expressed as the mean \pm SD as compared to mock condition in three independent experiments. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the *Student's t-test* ($p < 0.05$). (B) After incubation, cell culture supernatants were harvested and stored at -20°C . GM-CSF was measured by ELISA (R&D Systems). Data are expressed as the mean \pm SD from two independent experiments performed in triplicate. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the *Student's t-test* ($p < 0.05$).

419 pg/mL) upon LPS exposure without BG priming, this production was significantly higher
420 with BG-enriched compounds (350 pg/mL and 450 pg/mL with BG65 and BG75 pre-
421 treatment, respectively). Dectin-1-deficiency completely abolished GM-CSF secretion. This
422 result supports the view that GM-CSF production is strongly triggered by dectin-1 signaling.
423 These results were also confirmed in the DBA/2 strain background (Fig S3).

424 Significant *Fhl2* upregulation in BG-enriched conditions was also confirmed by qPCR (Fig
425 5A). As *Fhl2* expression seems to be highly correlated with the BG degree of purity, we next
426 investigated the influence of dectin-1 on *Fhl2* transcription following incubation with BG
427 compounds. Then, WT and *Clec7a*^{-/-} BMDM from C57Bl/6 were incubated under varying
428 time and conditions to examine *Fhl2* expression. In WT cells, the gene was not expressed,
429 even following treatment with crude BG15 and whatever the incubation time (Fig 5B).
430 However, a strong and early induction of *Fhl2* was triggered by BG-enriched compounds
431 BG65 and BG75 (30-fold and 5-fold upregulations at 4 h, respectively), and decreased but
432 stayed elevated until 16 h of interaction (10-fold and around 5-fold higher for BG65 and
433 BG75, respectively). Interestingly, dectin-1-deficiency entailed a severe loss of *Fhl2*
434 induction following BG65 treatment and abolished it completely after BG75 incubation at all
435 timetable point. *Clec7a*^{-/-} BMDM pretreated with BG65 or BG75 poorly upregulated *Fhl2*
436 expression upon LPS stimulation as compared to WT cells (5-fold higher in *Clec7a*^{-/-} BMDM
437 versus 20-fold and 30-fold in WT BMDM for BG65 and BG75 conditions, respectively) (Fig
438 5C). Western Blotting on BMDM lysates confirmed that FHL2 protein was more abundant
439 upon treatment with BG65 and BG75 than with BG15 and was not detectable in untreated
440 cells, with or without LPS stimulation (Fig 5D). Therefore, BG-enriched *Sc* CW compounds
441 induce FHL2 expression, essentially via the dectin-1 pathway. To appreciate the role of FHL2
442 in the induction of immune response through dectin-1, TNF α was quantified in supernatants
443 from *Fhl2*^{-/-} BMDM stimulated with BG-containing extracts. Surprisingly, the absence of

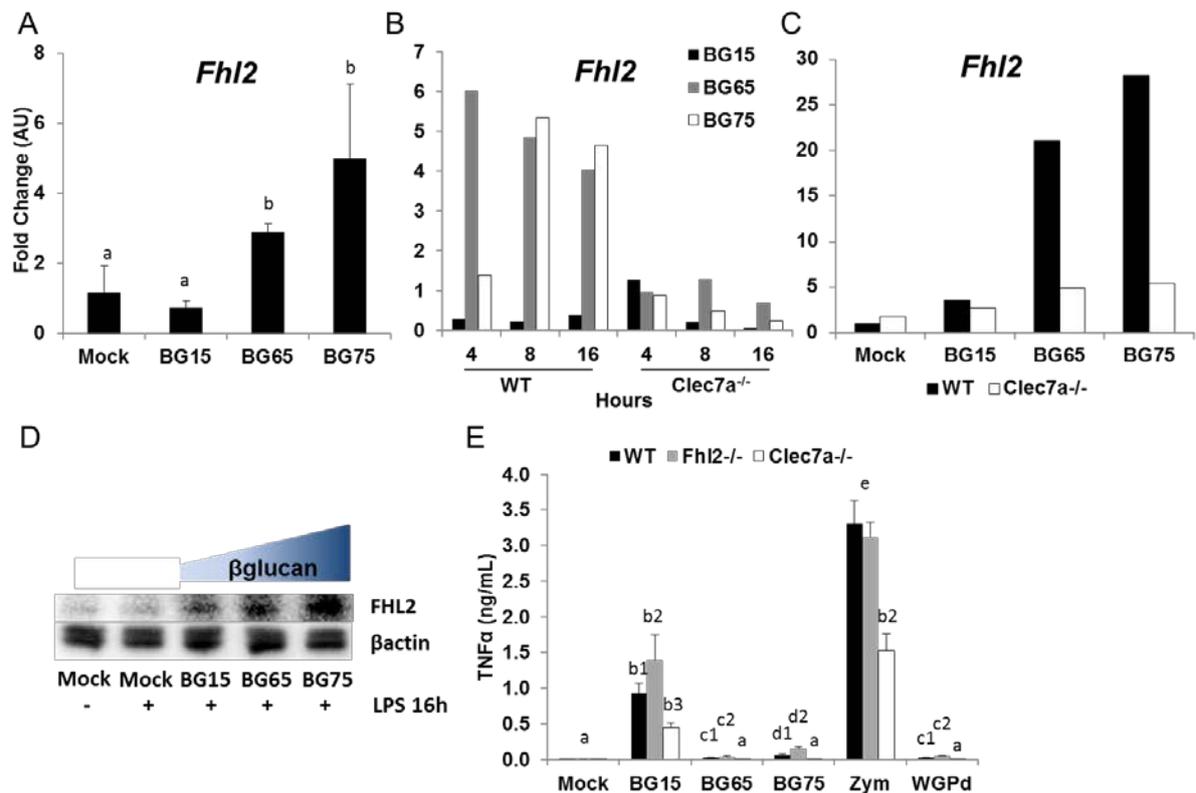


Figure 5 Walachowski et al

FIGURE 5. *Sc* BG-enriched compounds induce FHL2 upregulation under the control of dectin-1.

(A) WT BMDM from C57Bl/6 mice were stimulated as described above (Fig 4A). *Fhl2* expression was determined by RT-qPCR as done for *Csf2*. (B) WT or *Clec7a*^{-/-} BMDM were stimulated with *Sc* BG-enriched compounds for 4, 8 or 16 h. At the end of the incubation, supernatants were discarded and BMDM were lysed in RLT lysis buffer. RNA were extracted and pooled, cDNA synthesis and RT-qPCR were performed as previously described. Data are expressed as the fold change related to the mock value, representative of two experiments performed in triplicate. (C) BMDM from WT or *Clec7a*^{-/-} C57Bl/6 mice were stimulated following the same protocol as in (A). (D) WT BMDM from C57Bl/6 mice were stimulated as before. BMDM were lysed in RIPA buffer supplemented with 5mM EDTA and protease inhibitor (Pierce™). After clarification (centrifugation at 14,000 rpm, 10 min) and protein quantitation using BCA kit (Pierce™), lysates (10 mg of total proteins) were subjected to Western blotting with anti-FHL2 (F4B2-B11) and anti-βactin (C4) as control, mAbs (Santa Cruz Biotechnologies). The data are representative of 3 independent experiments performed in triplicate. (E) WT, *Fhl2*^{-/-} or *Clec7a*^{-/-} BMDM were stimulated with 100 μg/mL of BG-containing *Sc* CW compounds for 8 h. After incubation, cell culture supernatants were then collected and stored at -20°C. TNFα was further quantified by

ELISA. Data are expressed as the mean \pm SD from two independent experiments performed in triplicate. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the *Student's t-test* ($p < 0.05$).

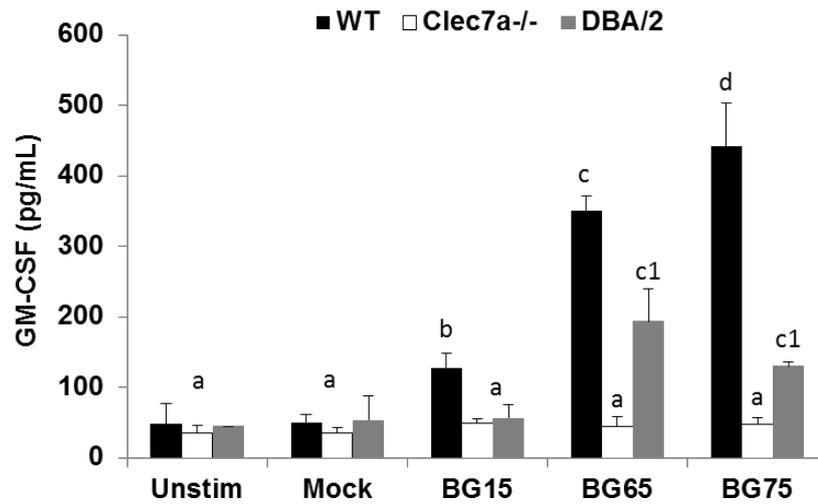


Figure S3 *Walachowski et al*

FIGURE S3. GM-CSF response from DBA/2 macrophages to *Sc* CW extracts is synergized after TLR ligands or bacteria exposure according to their BG-content.

BMDM from DBA/2 (or WT or *dectin1*^{-/-} C57Bl/6) mice were stimulated with 100 µg/mL of BG-enriched *Sc* CW compounds for 8 h. After incubation, cell culture supernatants were removed and BMDM were then stimulated with 100 ng/ml of ultraPure LPS for 48 h. At the end of the incubation, supernatants were collected and immediately stored at -20°C. GM-CSF was measured with a cytokine detection kit. Data are expressed as the mean of value ± SD from two independent experiments performed in triplicate. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the *Student's t-test* ($p < 0.05$).

444 FHL2 resulted in a significant increase of TNF α secretion in BG-enriched *Sc* CW- and in
445 BG15-incubated BMDM, whereas amounts triggered by zymosan remained unchanged (Fig
446 5E). Similarly, when cells were secondly stimulated with LPS, the cytokine production by
447 *Fhl2*^{-/-} BMDM following BG15 and WGPd pretreatment were significantly enhanced
448 although a trend seems to occur for BG65 and BG75 (Fig S4). The last results suggest that
449 FHL2 acts as a regulator of inflammatory response after dectin-1 triggering.

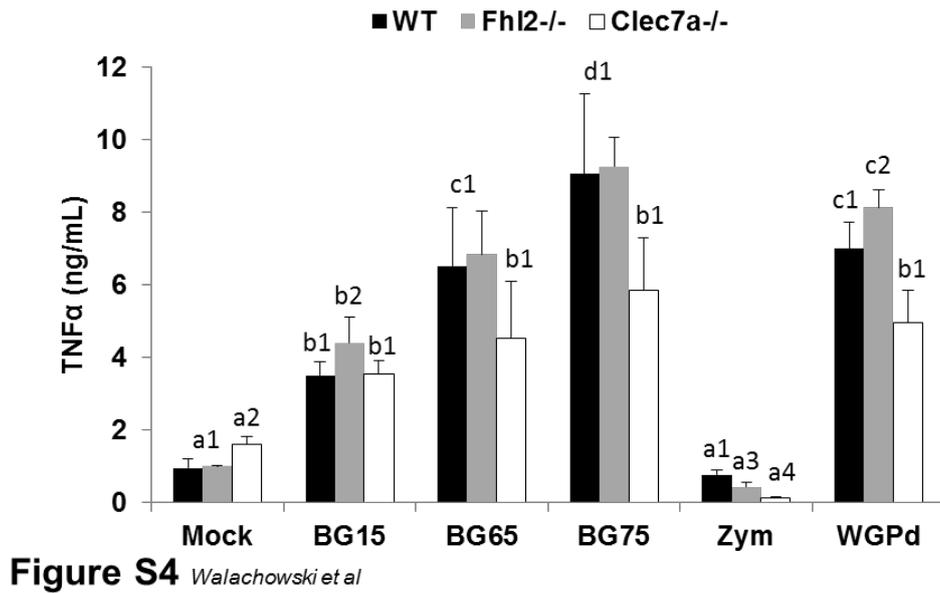


FIGURE S4. The loss of FHL2 induces upregulation *Sc* BG-enriched compounds under the control of dectin-1.

BMDM from WT, Fhl2^{-/-} or Clec7a^{-/-} mice were stimulated with 100 µg/mL of BG-enriched *Sc* CW compounds for 8 h. After incubation, cell culture supernatants were removed and BMDM were then stimulated with 100 ng/ml of ultraPure LPS for 16 h. At the end of the incubation, supernatants were collected and immediately stored at -20°C. TNFα was measured with a cytokine detection kit. Data are expressed as the mean of value ± SD from two independent experiments performed in triplicate. Mean values not sharing the same letter are significantly different according to the *Student's t-test* ($p < 0.05$).

450 **Discussion**

451 In this report, we aim to describe the mechanisms by which BG upon interaction with Dectin-
452 1 promoted the inflammatory response. Dectin-1 has recently emerged as a key mediator of
453 antifungal responses, and mice lacking dectin-1 were shown to be more susceptible to
454 systemic fungal infections [6,11]. Furthermore, dectin-1 was identified as an important
455 partner of TLR2/4 on macrophages and dendritic cells for the production of inflammatory
456 cytokines in response to particulate stimuli containing BG, like zymosan [4,5,7,31]. However,
457 binding dectin-1 alone is not sufficient to trigger relevant cytokine secretion, as well as
458 neutrophil recruitment by murine macrophages as we recently demonstrated using BG-
459 enriched *Sc* CW extracts [28]. To fully understand the underlying mechanisms associated to
460 the dectin-1-BG interaction in immune activation, it is pivotal to determine the effects of BG
461 training on the cytokine response by macrophages using highly purified ligands. In the current
462 study, we extended the investigation of the synergistic properties observed using a
463 combination of various ligands simultaneously, to a two-step immune training using a first
464 exposure to BG-containing extracts (including BG-enriched extracts) followed by a second
465 stimulation with live bacteria or pure components of bacterial cell walls. We have shown that
466 only BG-enriched compounds (BG65 and BG75) were able to strongly prime different types
467 of macrophages (BMDM and TEPM) for enhanced pro-inflammatory (TNF α and IL-1 β) as
468 well as anti-inflammatory (IL-10) cytokines production when they are exposed to a secondary
469 bacterial stimulus. This synergistic activity of BG-enriched extracts was mediated by dectin-1
470 as suggested by experiments with cells genetically deficient for this receptor revealing
471 abolition of the synergy. Interestingly, it also appeared that the boosted cell response was
472 even more inhibited in the case of *Staphylococcus aureus* bacteria. Despite this fact, a residual
473 amplification of the cell response remained in the latest cases, meaning that a negligible part
474 of the signal may result from interactions between BG and other receptors. Seemingly, the

475 synergistic response of IL-1 β was much more consistent with Pam3 and *E. coli* than LPS and
476 *S. aureus* in BG-enriched WT BMDM, suggesting that mechanism which leads to this
477 cytokine release differ from the one which induces TNF α production. Also, cell response was
478 more consistent in BG65- than in BG75-condition upon Pam3 or LPS stimulation that could
479 be reminiscent of collaboration with other PRRs. Because priming effects induced by BG-
480 enriched extracts were not only restricted to pure TLR ligands but also extended to the whole
481 live bacteria, we tended to conclude that synergistic effects of dectin-1 signal as common to
482 several TLR-dependent pathways. This BG priming effects were also observed by *Ifrim et al*,
483 who used the same priming method using BG from *Candida albicans* and pure ligands or heat
484 killed bacteria as a secondary stimulus on human PBMC [32]. This was confirmed by the data
485 obtained with *MyD88*-deficient macrophages, where LPS-amplified TNF α response was
486 totally lost after BG-enriched incubation. We can rightly assert that TLR-dectin-1-mediated
487 induction of TNF α production is dependent on NF κ B. This effect is in line with previous
488 studies showing that collaboration between dectin-1 and TLRs leads to subsequent activation
489 of NF κ B [4,5,18,20,33]. However, although NF κ B/AP-1 activity increased in all BG-
490 conditions, we did not observe any synergistic promotion of this activity after BG-enriched
491 treatment.

492 *Ifrim et al* suggested that BG exerts a strong priming effect toward restimulation through
493 dectin-1 and the noncanonical Raf-1 pathway, whereas dectin-1 direct signaling seems to be
494 mediated by the canonical Syk-dependent pathway [32]. Furthermore, we showed that BG-
495 dependent synergistic response occurred following a delayed time course as shown by Fig 2B
496 and Fig S1D. These data strongly suggest that the *de novo* synthesis of intermediates is
497 required to shape the inflammatory response.

498 In line with these observations, networks and functions analysis performed using IPA and
499 DAVID bioinformatics softwares on the transcriptomic assay data evidenced enrichment for

500 generic functions such as inflammatory response, molecular transport, defense response, cell
501 communication and intracellular signaling cascade/signal transduction associated to
502 regulation of phosphorylation. More BG-associated specific functions were evidenced by the
503 microarray analysis including macropinocytosis, cell growth, proliferation and differentiation,
504 cytokine activity, JAK-STAT cascade, MAPK and IL-10 signaling pathway and signaling
505 molecule synthesis (confirming our previous hypothesis). Our data were consistent with the
506 effects widely reported in the literature including MAPK, and to a lesser extent JAK-STAT
507 involvement downstream dectin-1 engagement and Syk/CARD9 activation
508 [10,14,18,19,21,26,33–35]. Although Syk has been shown to be recruited to a phosphorylated
509 ITAM-motif after dectin-1 triggering leading to IL-10 or IL-2 production [17,36,37], some
510 dectin-1-mediated responses such as phagocytosis remain Syk-independent in macrophages
511 [38]. Nevertheless, *Dennehy et al* reported that collaborative signaling between dectin-1 and
512 MyD88-coupled TLRs requires activation of Syk, that afford sustained I κ B degradation
513 resulting in nuclear translocation of NF κ B and further TNF α production [5]. TP53, the tumor
514 suppressor p53 that was identified in our gene expression analysis, was reported to be
515 necessary for conventional NF κ B p65-mediated TNF α production [39]. BG-enriched priming
516 upon LPS exposure on BMDM also pointed out IL-10 signaling pathway and involvement of
517 CREB and STAT3 that are also correlated with the MAPK and the JAK-STAT pathways.
518 Indeed, zymosan-induced IL-10 was shown to depend on TLR2/dectin-1-mediated activation
519 of the calcium-dependent ERK-MAPK pathway and the phosphorylation of CREB; That
520 secretion of IL-10 further leads to the phosphorylation of STAT3 via an autocrine feedback
521 loop [21,35,40,41]. In line with our findings (Fig S2), the transcription factor CREB mediates
522 an NF κ B- and MAPK-dependent anti-apoptotic signal in macrophages and monocytes, which
523 promotes survival and enhancement of host response following a LPS/TLR4 signaling [42].

524 The ability of dectin-1 to initiate an ITAM-Syk signaling through NFAT was largely
525 described [20], although we missed to sort this function from our analysis. However, *Cox2*
526 (*Ptgs2*) was identified as one of the most upregulated genes by BG-enriched priming (Fig 3).
527 Consistently, induction of *Cox2* was shown to be dectin-1-mediated by a NFAT-dependent
528 signaling, as well as the transcription factor Egr2 [20,43] - Egr1 being regulated by ERK-
529 JNK-dependent signal - that were also upregulated by our BG-enriched compounds (Fig S2),
530 both leading to sustained expression of other pro-inflammatory mediators such as TNF α or
531 IL-6 [44–46], macrophages [47] and B/T lymphocytes proliferation [48,49]. This could
532 explain why we observed such a synergistically TNF α production after BG-enriched training
533 without such an amplification of NF κ B activity. As NFAT was described as an activation and
534 differentiation factor in T cells, it is not surprising to identify functions implying the role of
535 cytokines in mediating communication between immune cells, the hematopoiesis from stem
536 cells or the differential regulation of cytokine production in macrophages and T helper cells
537 by IL-17. In line with these findings, integration of TLR and dectin-1 was shown to direct T
538 helper cell differentiation (T_H1 and T_H17) by a canonical (CARD9) and noncanonical NF κ B
539 pathway that requires Syk and Raf-1 [10,50], but also through NFAT-dependent pathway
540 [43].

541 The microarray analysis consistently identified *Csf2* (that encodes GM-CSF), the keystone or
542 the gene network, and *Fhl2* as the two main upregulated genes by BG65 and BG75 priming
543 conditions. IPA and DAVID analysis revealed their enrichment for functions listed
544 previously, inflammatory response, proliferation and differentiation of bone marrow
545 progenitors, migration and binding of cells, in antigen presentation and cell survival, immune
546 cell trafficking and development of hematological system. These two genes further targeted
547 pathways highlighting the crucial role of cytokines as mediators of the communication
548 between the innate and the adaptive response, as described above.

549 Unexpectedly, we identified *Fhl2* as the second most upregulated gene in BG-enriched
550 extracts-primed macrophages toward LPS stimulation. Indeed, *Fhl2* expression was
551 synergistically and specifically induced by BG65 and BG75 treatment, which was totally
552 abrogated in *Clec7a*^{-/-} cells (Fig 5). These findings were also confirmed at protein levels. We
553 further showed that overexpression of *Fhl2* occurred through direct dectin-1 triggering by
554 BG-enriched extracts. Here, we revealed for the first time the involvement of *Fhl2* in dectin-
555 1-mediated pathway. The Four-and-a-half LIM-only protein 2 (FHL2), which functional
556 diversity could result from its different protein partners, is an important mediator in many
557 signaling pathways including NFκB signaling pathways [51,52] or TGFβ signaling [53,54], as
558 reviewed in [55]. *Fhl2* is expressed in a cell-and tissue-specific manner and molecular
559 mechanisms by which this protein exerts its roles remain incompletely understood, especially
560 in cells where its expression is limited or absent. In this study, we established for the first time
561 not only the *Fhl2* expression in macrophages, but also its induction after dectin-1/BG-
562 enriched particles interaction. Previous studies revealed that *Fhl2* can interact with NFκB
563 depending on the cell-context. Indeed, FHL2 has been shown to inhibit NFκB activity in
564 osteoclastogenesis by displacing TRAF6 from RANK [56], that seems to be consistent with
565 our data in BMDM. However, FHL2 was shown to mediate IL-6 production through NFκB
566 and p38 MAPK signaling pathway in muscle cells [52]. Similarly, FHL2-deficiency in
567 macrophages significantly reduced TNFα and IL-6 production following LPS exposure,
568 showing that FHL2 acts as a positive regulator of NFκB through TRAF6 in liver macrophages
569 [51] but also in FHL2-transfected HEK cells [57]. However, we evidenced that in BMDM, the
570 loss of FHL2 enhanced the cytokine production following a BG treatment with or without a
571 secondary stimulus. This reinforces the hypothesis that the role of FHL2 is highly dependent
572 of the cell type but also of the populations of tissue macrophages, sometimes as a regulator
573 and sometimes as an enhancer of cytokine production. In addition, the last authors also

574 revealed that FHL2 alone was not sufficient to induce NFκB responsive promoters. In line
575 with this, FHL2 was reported to co-activate several transcription factors including AP-1 [58]
576 and CREB [59], with the possibility of direct and indirect interactions (through p38- or
577 ERK2-MAPK [60]) between FHL2 and CREB. As we reported a non-synergistic activation of
578 NFκB/AP-1 following a BG-enriched treatment upon TLR stimulation despite a great
579 increase of cytokine production, we could hypothesize that similarly to this study, FHL2
580 could regulate MAPK or CREB signaling triggered by dectin-1 pathway.

581 FHL2 is also able to bind and activate the TP53 promoter in hepatic cells [61] and inversely,
582 TP53 regulates *Fhl2* expression at the transcriptional level [62], that could explain why we
583 evidenced TP53 involvement as upstream regulators in BG-enriched mediated response upon
584 LPS exposure. Thus, we formulated the attractive hypothesis that FHL2 may act as a regulator
585 of the dectin-1/NFκB pathways. Indeed, early overexpression of FHL2 triggered by direct
586 BG-enriched/dectin-1 interaction could lower NFκB, MAPK or to moderate TNFα production
587 by macrophages. However, whether BG/ dectin-1 interaction induces FHL2 remains unclear
588 and would deserve further investigations to identify the molecular mechanisms.

589 Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) was previously linked to the
590 dectin-1-mediated response, as addition of GM-CSF to BG-treated macrophages was shown
591 to increase BG responsiveness by synergizing cytokine production and upregulating dectin-1
592 expression on cells [22,24,25,27,63]. However, the direct relation between BG and GM-CSF
593 remains poorly described by authors, as only few of them reported induction of *Csf2*
594 consequently to the BG recognition by dectin-1 on macrophages. Indeed, *Masuda et al*
595 observed increasing TNFα and GM-CSF release in peritoneal resident macrophages following
596 incubation with curdlan, zymosan and soluble BG extracted from maitake mushroom, that
597 resulted from two different signaling pathways, the early one induced by a dectin-1-
598 independent ERK and MAPK signaling and the late one triggered through dectin-1 and Syk

599 [22]. In a previous study, we evidenced the late dectin-1-dependent overexpression of *Csf2*
600 following BG65 and BG75 treatment [28], which could prime our BMDM to respond to the
601 secondary microbial stimulus. Consistently with this hypothesis, compared to controls, GM-
602 CSF-treated macrophages exposed to TLR2 or 4 ligands were shown to produce significantly
603 more IL-1 β , IL-6 and TNF α , but lower PGES mRNA expression and so PGE2 production
604 reducing the lipid metabolism [24,25,64]. Furthermore, GM-CSF was able to prevent
605 endotoxin tolerance in macrophages by restoring TNF α production on LPS-tolerized human
606 monocytes [65]. We identified the MAPK-ERK as targeted pathway activated upon BG-
607 enriched exposure following LPS stimulation, suggesting that GM-CSF upregulation could
608 intensify and sustain the BG-enriched/LPS-mediated macrophages activation through this
609 signaling pathway, as suggested by *Min et al* who used curdlan combined to GM-CSF on
610 dendritic cells [26]. This explains why integration of both signals affords a more effective
611 response to potential invading pathogens than each ligand alone. Consistently, they found that
612 GM-CSF was required to trigger the curdlan-dependent MAPK phosphorylation ensuring the
613 robust production of TNF α , IL-6, IL-1 β and subsequent T_H cell polarization (also reviewed in
614 [66]). GM-CSF requisite was also evoked for CREB phosphorylation and *Egr1* transcription
615 [67]. Thus, it seems that BG are able to preprogram macrophages by inducing their
616 production GM-CSF in a dectin-1, which can act by an autocrine loop and afford them to
617 manner respond synergistically to a secondary stimulus. In this line, we could hypothesize
618 that the late induction of GM-CSF could inhibit the regulatory effect of primary FHL2 signal
619 to promote a consistent and synergic cytokine production in response to BG-enriched
620 particles.

621 From similar observations, raised the principle of trained immunity by which BG/dectin-1
622 interaction would induce epigenetic reprogramming, leading to cellular activation, enhanced
623 cytokine production and also metabolic state of cells shift, recently reviewed in [68] and

624 firstly described in [69]. Characteristics of trained immunity rely on the absence of a
625 subsequent response upon a primary BG-enriched treatment; thereafter, when cells are
626 exposed to as secondary microbial stimuli, they are able to elicit a strong inflammatory and
627 protective signature. Our findings further suggest that GM-CSF and FHL2 could be
628 complementary involved in the training program of macrophages mediated by BG-enriched
629 extracts, as GM-CSF expression is strongly correlated with the synergistic production of
630 cytokine whereas FHL2 seems to control cell activation. In line with this hypothesis, GM-
631 CSF was demonstrated to prime monocytes and to restore cytokine production in LPS-
632 tolerized cells [65]. Indeed, endotoxin tolerance is characterized by a decreased production of
633 proinflammatory cytokine by macrophages in response to LPS following a first exposure to
634 the same primary stimulus. This phenomenon was previously extended to zymosan and to
635 BG15 pretreatment in macrophages by us and others [40,65,70], as they induced strong
636 induction of TNF α by themselves but remain unable to trigger any response to the secondary
637 stimulus (and even more at high concentrations, Fig 2). It was further suggested that
638 zymosan, which elicited various pathways through a unique exposure, could program cells to
639 suppress immune response notably by triggering production of immunosuppressors as IL-10
640 and TGF β or by reducing the expression or GM-CSF receptor on cells [22]. Interestingly,
641 TGF β pathway is inhibited by BG-enriched extracts through upregulation of vasorin (*Vasn*)
642 (Table 1). Consequently, we feel that the trained immunity concept firstly raised by *Netea et*
643 *al* has become a new paradigm in immunology. Although more investigations are needed to
644 improve knowledge in this field, our data so far suggest that trained innate immunity would
645 be of great interest to treat a variety of inflammatory diseases by modulating the state of
646 cellular activation. Our findings might also be relevant for the design of novel adjuvant
647 formulations.

648 **Conclusion**

649 Altogether, we identified a strong BG-enriched-associated synergy in microbial-stimulated
650 macrophages. The integration of both signals strongly affected the inflammatory response,
651 resulting in an enhanced upregulation of several pathway mediators, in a potent cytokines and
652 chemokines release as well as in a superior capacity in cell survival and immune cells
653 recruitment. We furthermore identified FHL2 and GM-CSF as the possible targets specifically
654 upregulated by BG-enriched incubation upon TLR-ligand second signal. Our results suggest
655 that GM-CSF is a late consequence of dectin-1-engagement which synergizes the BG-
656 enriched-mediated response of macrophages as well as FHL2 that acts under dectin-1 as a
657 regulator of NF κ B activity. Although how FHL2, GM-CSF and dectin-1 signaling pathways
658 integrate to modulate cytokine production remains elusive, these results ascribe for the first
659 time a crucial role for FHL2 in orchestration of the inflammatory response mediated by
660 dectin-1.

661 **Acknowledgments**

662 The authors would like to thank Dr. R. Volmer from IHAP (INRA, Toulouse) for generously
663 supplying us with the iBMDM cell line and Dr. A. Roulet from the GeT-PlaGe platform
664 (INRA, Toulouse) for analyzing gene expression using Biomark HD system (Fluidigm). We
665 also thank Dr. Y. Lippi from the GeT-TRiX platform (Toxalim, INRA, Toulouse) for helping
666 in the microarray analysis. Finally, we thank Pr. GD. Brown (University of Aberdeen) for
667 supplying us with C57Bl/6 *Clec7a*^{-/-} mice and Dr. Yu Wei (Pasteur Institute, Paris, France)
668 for *Fhl2*^{-/-} mice.

669 **References**

- 670 1. Taylor PR, Martinez-Pomares L, Stacey M, Lin H-H, Brown GD, Gordon S. Macrophage Receptors
671 and Immune Recognition. *Annu Rev Immunol.* 2005;23: 901–944.
672 doi:10.1146/annurev.immunol.23.021704.115816
- 673 2. Creagh EM, O’Neill LAJ. TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in
674 innate immunity. *Trends Immunol.* 2006;27: 352–357. doi:10.1016/j.it.2006.06.003
- 675 3. Goodridge HS, Underhill DM. Fungal Recognition by TLR2 and Dectin-1. *Handb Exp Pharmacol.*
676 2008; 87–109. doi:10.1007/978-3-540-72167-3_5
- 677 4. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of
678 inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med.* 2003;197: 1107–1117.
679 doi:10.1084/jem.20021787
- 680 5. Dennehy KM, Ferwerda G, Faro-Trindade I, Pyz E, Willment JA, Taylor PR, et al. Syk kinase is
681 required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like
682 receptors. *Eur J Immunol.* 2008;38: 500–506. doi:10.1002/eji.200737741
- 683 6. Saijo S, Fujikado N, Furuta T, Chung S, Kotaki H, Seki K, et al. Dectin-1 is required for host
684 defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol.* 2007;8:
685 39–46. doi:10.1038/ni1425
- 686 7. Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg B-J, Netea MG, Adema GJ. Dectin-1 synergizes with
687 TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell*
688 *Microbiol.* 2008;10: 2058–2066. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01188.x
- 689 8. Lebron F, Vassallo R, Puri V, Limper AH. *Pneumocystis carinii* Cell Wall β -Glucans Initiate
690 Macrophage Inflammatory Responses through NF- κ B Activation. *J Biol Chem.* 2003;278: 25001–
691 25008. doi:10.1074/jbc.M301426200
- 692 9. Yadav M, Schorey JS. The β -glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate
693 macrophage activation by mycobacteria. *Blood.* 2006;108: 3168–3175. doi:10.1182/blood-
694 2006-05-024406
- 695 10. LeibundGut-Landmann S, Groß O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, et al. Syk- and
696 CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce
697 interleukin 17. *Nat Immunol.* 2007;8: 630–638. doi:10.1038/ni1460
- 698 11. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, et al. Dectin-1 is required for
699 β -glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.* 2007;8: 31–38.
700 doi:10.1038/ni1408
- 701 12. Netea MG. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans
702 and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest.* 2006;116: 1642–1650.
703 doi:10.1172/JCI27114
- 704 13. Underhill DM, Rosnagle E, Lowell CA, Simmons RM. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a
705 dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood.* 2005;106: 2543–2550.
706 doi:10.1182/blood-2005-03-1239

- 707 14. Goodridge HS, Shimada T, Wolf AJ, Hsu Y-MS, Becker CA, Lin X, et al. Differential Use of CARD9
708 by Dectin-1 in Macrophages and Dendritic Cells. *J Immunol.* 2009;182: 1146–1154.
709 doi:10.4049/jimmunol.182.2.1146
- 710 15. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, et al. Dectin-1 Is
711 A Major β -Glucan Receptor On Macrophages. *J Exp Med.* 2002;196: 407–412.
712 doi:10.1084/jem.20020470
- 713 16. Lipke PN, Ovalle R. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *J*
714 *Bacteriol.* 1998;180: 3735–3740.
- 715 17. Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, et al. Syk-Dependent
716 Cytokine Induction by Dectin-1 Reveals a Novel Pattern Recognition Pathway for C Type Lectins.
717 *Immunity.* 2005;22: 507–517. doi:10.1016/j.immuni.2005.03.004
- 718 18. Gross O, Gewies A, Finger K, Schäfer M, Sparwasser T, Peschel C, et al. Card9 controls a non-TLR
719 signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature.* 2006;442: 651–656.
720 doi:10.1038/nature04926
- 721 19. Osorio F, Reis e Sousa C. Myeloid C-type Lectin Receptors in Pathogen Recognition and Host
722 Defense. *Immunity.* 2011;34: 651–664. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.001
- 723 20. Goodridge HS, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or
724 zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol Baltim Md*
725 *1950.* 2007;178: 3107–3115.
- 726 21. Elcombe SE, Naqvi S, Van Den Bosch MWM, MacKenzie KF, Cianfanelli F, Brown GD, et al.
727 Dectin-1 Regulates IL-10 Production via a MSK1/2 and CREB Dependent Pathway and Promotes
728 the Induction of Regulatory Macrophage Markers. *PLoS ONE.* 2013;8: e60086.
729 doi:10.1371/journal.pone.0060086
- 730 22. Masuda Y, Togo T, Mizuno S, Konishi M, Nanba H. Soluble β -glucan from *Grifola frondosa*
731 induces proliferation and Dectin-1/Syk signaling in resident macrophages via the GM-CSF
732 autocrine pathway. *J Leukoc Biol.* 2012;91: 547–556. doi:10.1189/jlb.0711386
- 733 23. Harada T, Ohno N. Contribution of dectin-1 and granulocyte macrophage–colony stimulating
734 factor (GM-CSF) to immunomodulating actions of β -glucan. *Int Immunopharmacol.* 2008;8:
735 556–566. doi:10.1016/j.intimp.2007.12.011
- 736 24. Sorgi CA, Rose S, Court N, Carlos D, Paula-Silva FWG, Assis PA, et al. GM-CSF Priming Drives
737 Bone Marrow-Derived Macrophages to a Pro-Inflammatory Pattern and Downmodulates PGE2
738 in Response to TLR2 Ligands. *PLoS ONE.* 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0040523
- 739 25. Däbritz J, Weinhage T, Varga G, Wirth T, Walscheid K, Brockhausen A, et al. Reprogramming of
740 Monocytes by GM-CSF Contributes to Regulatory Immune Functions during Intestinal
741 Inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2015;194: 2424–2438.
742 doi:10.4049/jimmunol.1401482
- 743 26. Min L, Isa SABM, Fam WN, Sze SK, Beretta O, Mortellaro A, et al. Synergism between Curdlan
744 and GM-CSF Confers a Strong Inflammatory Signature to Dendritic Cells. *J Immunol.* 2012;188:
745 1789–1798. doi:10.4049/jimmunol.1101755

- 746 27. Willment JA, Lin H-H, Reid DM, Taylor PR, Williams DL, Wong SYC, et al. Dectin-1 Expression and
747 Function Are Enhanced on Alternatively Activated and GM-CSF-Treated Macrophages and Are
748 Negatively Regulated by IL-10, Dexamethasone, and Lipopolysaccharide. *J Immunol*. 2003;171:
749 4569–4573. doi:10.4049/jimmunol.171.9.4569
- 750 28. Walachowski S, Tabouret G, Foucras G. Triggering Dectin-1-Pathway Alone Is Not Sufficient to
751 Induce Cytokine Production by Murine Macrophages. *PloS One*. 2016;11: e0148464.
752 doi:10.1371/journal.pone.0148464
- 753 29. Accarias S, Lugo-Villarino G, Foucras G, Neyrolles O, Boullier S, Tabouret G. Pyroptosis of
754 resident macrophages differentially orchestrates inflammatory responses to *Staphylococcus*
755 *aureus* in resistant and susceptible mice. *Eur J Immunol*. 2014; doi:10.1002/eji.201445098
- 756 30. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Systematic and integrative analysis of large gene lists
757 using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*. 2009;4: 44–57. doi:10.1038/nprot.2008.211
- 758 31. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 Mediates the
759 Biological Effects of β -Glucans. *J Exp Med*. 2003;197: 1119–1124. doi:10.1084/jem.20021890
- 760 32. Ifrim DC, Joosten LAB, Kullberg B-J, Jacobs L, Jansen T, Williams DL, et al. *Candida albicans*
761 primes TLR cytokine responses through a Dectin-1/Raf-1-mediated pathway. *J Immunol Baltim*
762 *Md* 1950. 2013;190: 4129–4135. doi:10.4049/jimmunol.1202611
- 763 33. Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, Katsumoto TR, Ma J, Wolf AJ, et al. Activation of the innate
764 immune receptor Dectin-1 upon formation of a “phagocytic synapse.” *Nature*. 2011;472: 471–
765 475. doi:10.1038/nature10071
- 766 34. Öhman T, Teirilä L, Lahesmaa-Korpinen A-M, Cypryk W, Veckman V, Saijo S, et al. Dectin-1
767 Pathway Activates Robust Autophagy-Dependent Unconventional Protein Secretion in Human
768 Macrophages. *J Immunol*. 2014;192: 5952–5962. doi:10.4049/jimmunol.1303213
- 769 35. Kelly EK, Wang L, Ivashkiv LB. Calcium-Activated Pathways and Oxidative Burst Mediate
770 Zymosan-Induced Signaling and IL-10 Production in Human Macrophages. *J Immunol Baltim Md*
771 1950. 2010;184: 5545–5552. doi:10.4049/jimmunol.0901293
- 772 36. Gow NAR, Netea MG, Munro CA, Ferwerda G, Bates S, Mora-Montes HM, et al. Immune
773 Recognition of *Candida albicans* β -glucan by Dectin-1. *J Infect Dis*. 2007;196: 1565–1571.
774 doi:10.1086/523110
- 775 37. Slack EC, Robinson MJ, Hernanz-Falcón P, Brown GD, Williams DL, Schweighoffer E, et al. Syk-
776 dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan.
777 *Eur J Immunol*. 2007;37: 1600–1612. doi:10.1002/eji.200636830
- 778 38. Herre J, Marshall ASJ, Caron E, Edwards AD, Williams DL, Schweighoffer E, et al. Dectin-1 uses
779 novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood*. 2004;104: 4038–4045.
780 doi:10.1182/blood-2004-03-1140
- 781 39. Schneider G, Henrich A, Greiner G, Wolf V, Lovas A, Wiczorek M, et al. Cross talk between
782 stimulated NF- κ B and the tumor suppressor p53. *Oncogene*. 2010;29: 2795–2806.
783 doi:10.1038/onc.2010.46

- 784 40. Dillon S. Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-
785 presenting cells and immunological tolerance. *J Clin Invest*. 2006;116: 916–928.
786 doi:10.1172/JCI27203
- 787 41. Xu S, Huo J, Lee K-G, Kurosaki T, Lam K-P. Phospholipase C γ 2 Is Critical for Dectin-1-mediated
788 Ca²⁺ Flux and Cytokine Production in Dendritic Cells. *J Biol Chem*. 2009;284: 7038–7046.
789 doi:10.1074/jbc.M806650200
- 790 42. Park JM, Greten FR, Wong A, Westrick RJ, Arthur JSC, Otsu K, et al. Signaling Pathways and
791 Genes that Inhibit Pathogen-Induced Macrophage Apoptosis— CREB and NF- κ B as Key
792 Regulators. *Immunity*. 2005;23: 319–329. doi:10.1016/j.immuni.2005.08.010
- 793 43. Tassi I, Cella M, Castro I, Gilfillan S, Khan WN, Colonna M. Requirement of phospholipase C- γ 2
794 (PLC γ 2) for Dectin-1-induced antigen presentation and induction of TH1/TH17 polarization. *Eur*
795 *J Immunol*. 2009;39: 1369–1378. doi:10.1002/eji.200839313
- 796 44. Decker EL, Nehmann N, Kampen E, Eibel H, Zipfel PF, Skerka C. Early growth response proteins
797 (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate
798 proinflammatory cytokine gene expression. *Nucleic Acids Res*. 2003;31: 911–921.
799 doi:10.1093/nar/gkg186
- 800 45. Guha M, O’Connell MA, Pawlinski R, Hollis A, McGovern P, Yan S-F, et al. Lipopolysaccharide
801 activation of the MEK-ERK1/2 pathway in human monocytic cells mediates tissue factor and
802 tumor necrosis factor α expression by inducing Elk-1 phosphorylation and Egr-1 expression.
803 *Blood*. 2001;98: 1429–1439. doi:10.1182/blood.V98.5.1429
- 804 46. Hoffmann E, Ashouri J, Wolter S, Doerrie A, Dittrich-Breiholz O, Schneider H, et al.
805 Transcriptional Regulation of EGR-1 by the Interleukin-1-JNK-MKK7-c-Jun Pathway. *J Biol Chem*.
806 2008;283: 12120–12128. doi:10.1074/jbc.M800583200
- 807 47. Krishnaraju K, Nguyen HQ, Liebermann DA, Hoffman B. The zinc finger transcription factor Egr-1
808 potentiates macrophage differentiation of hematopoietic cells. *Mol Cell Biol*. 1995;15: 5499–
809 5507.
- 810 48. Gururajan M, Simmons A, Dasu T, Spear BT, Calulot C, Robertson DA, et al. Early growth
811 response genes regulate B cell development, proliferation and immune response. *J Immunol*
812 *Baltim Md 1950*. 2008;181: 4590–4602.
- 813 49. Li S, Symonds ALJ, Zhu B, Liu M, Raymond MV, Miao T, et al. Early Growth Response Gene-2
814 (Egr-2) Regulates the Development of B and T Cells. *PLoS ONE*. 2011;6.
815 doi:10.1371/journal.pone.0018498
- 816 50. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Wevers B, Bruijns SCM, et al. Dectin-1
817 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF- κ B activation through Raf-1
818 and Syk. *Nat Immunol*. 2009;10: 203–213. doi:10.1038/ni.1692
- 819 51. Dahan J, Nouët Y, Jouvion G, Levillayer F, Adib-Conquy M, Cassard-Doulier A-M, et al. LIM-Only
820 Protein FHL2 Activates NF- κ B Signaling in the Control of Liver Regeneration and
821 Hepatocarcinogenesis. *Mol Cell Biol*. 2013;33: 3299–3308. doi:10.1128/MCB.00105-13
- 822 52. Wong C-H, Mak GW-Y, Li M-S, Tsui SK-W. The LIM-only protein FHL2 regulates interleukin-6
823 expression through p38 MAPK mediated NF- κ B pathway in muscle cells. *Cytokine*. 2012;59:
824 286–293. doi:10.1016/j.cyto.2012.04.044

- 825 53. Ding L, Wang Z, Yan J, Yang X, Liu A, Qiu W, et al. Human four-and-a-half LIM family members
826 suppress tumor cell growth through a TGF- β -like signaling pathway. *J Clin Invest*. 2009;
827 doi:10.1172/JCI35930
- 828 54. Xia T, Lévy L, Levillayer F, Jia B, Li G, Neuveut C, et al. The Four and a Half LIM-only Protein 2
829 (FHL2) Activates Transforming Growth Factor β (TGF- β) Signaling by Regulating Ubiquitination
830 of the E3 Ligase Arkadia. *J Biol Chem*. 2013;288: 1785–1794. doi:10.1074/jbc.M112.439760
- 831 55. Johannessen M, Møller S, Hansen T, Moens U, Ghelue MV. The multifunctional roles of the
832 four-and-a-half-LIM only protein FHL2. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2006;63: 268–284.
833 doi:10.1007/s00018-005-5438-z
- 834 56. Bai S, Kitaura H, Zhao H, Chen J, Müller JM, Schüle R, et al. FHL2 inhibits the activated
835 osteoclast in a TRAF6-dependent manner. *J Clin Invest*. 2005;115: 2742–2751.
836 doi:10.1172/JCI24921
- 837 57. Stilo R, Leonardi A, Formisano L, Di Jeso B, Vito P, Liguoro D. TUCAN/CARDINAL and DRAL
838 participate in a common pathway for modulation of NF- κ B activation. *FEBS Lett*. 2002;521:
839 165–169. doi:10.1016/S0014-5793(02)02869-7
- 840 58. Morlon A, Sassone-Corsi P. The LIM-only protein FHL2 is a serum-inducible transcriptional
841 coactivator of AP-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100: 3977–3982.
842 doi:10.1073/pnas.0735923100
- 843 59. Fimia GM, De Cesare D, Sassone-Corsi P. A Family of LIM-Only Transcriptional Coactivators:
844 Tissue-Specific Expression and Selective Activation of CREB and CREM. *Mol Cell Biol*. 2000;20:
845 8613–8622.
- 846 60. Purcell NH, Darwis D, Bueno OF, Müller JM, Schüle R, Molkentin JD. Extracellular Signal-
847 Regulated Kinase 2 Interacts with and Is Negatively Regulated by the LIM-Only Protein FHL2 in
848 Cardiomyocytes. *Mol Cell Biol*. 2004;24: 1081–1095. doi:10.1128/MCB.24.3.1081-1095.2004
- 849 61. Nouët Y, Dahan J, Labalette C, Levillayer F, Julien B, Jouvion G, et al. The four and a half LIM-
850 only protein 2 regulates liver homeostasis and contributes to carcinogenesis. *J Hepatol*.
851 2012;57: 1029–1036. doi:10.1016/j.jhep.2012.06.035
- 852 62. Xu J, Zhou J, Li M-S, Ng C-F, Ng Y-K, Lai PB-S, et al. Transcriptional Regulation of the Tumor
853 Suppressor FHL2 by p53 in Human Kidney and Liver Cells. *PLoS ONE*. 2014;9: e99359.
854 doi:10.1371/journal.pone.0099359
- 855 63. Harada T, Kawaminami H, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, et al. Cell to Cell
856 Contact Through ICAM-1-LFA-1 and TNF- α Synergistically Contributes to GM-CSF and
857 Subsequent Cytokine Synthesis in DBA/2 Mice Induced by 1,3- β -D-Glucan SCG. *J Interferon*
858 *Cytokine Res*. 2006;26: 235–247. doi:10.1089/jir.2006.26.235
- 859 64. Rosas M, Liddiard K, Kimberg M, Faro-Trindade I, McDonald JU, Williams DL, et al. The Induction
860 of Inflammation by Dectin-1 In Vivo Is Dependent on Myeloid Cell Programming and the
861 Progression of Phagocytosis. *J Immunol*. 2008;181: 3549–3557.
862 doi:10.4049/jimmunol.181.5.3549
- 863 65. Adib-Conquy M, Cavaillon J-M. Gamma Interferon and Granulocyte/Monocyte Colony-
864 stimulating Factor Prevent Endotoxin Tolerance in Human Monocytes by Promoting Interleukin-

- 865 1 Receptor-associated Kinase Expression and Its Association to MyD88 and Not by Modulating
866 TLR4 Expression. *J Biol Chem.* 2002;277: 27927–27934.
- 867 66. Shiomi A, Usui T, Shiomi A, Usui T. Pivotal Roles of GM-CSF in Autoimmunity and Inflammation,
868 Pivotal Roles of GM-CSF in Autoimmunity and Inflammation. *Mediat Inflamm Mediat Inflamm.*
869 2015;2015, 2015: e568543. doi:10.1155/2015/568543, 10.1155/2015/568543
- 870 67. Kwon EM, Raines MA, Blenis J, Sakamoto KM. Granulocyte-macrophage colony-stimulating
871 factor stimulation results in phosphorylation of cAMP response element-binding protein
872 through activation of pp90RSK. *Blood.* 2000;95: 2552–2558.
- 873 68. van der Meer JWM, Joosten LAB, Riksen N, Netea MG. Trained immunity: A smart way to
874 enhance innate immune defence. *Mol Immunol.* 2015;68: 40–44.
875 doi:10.1016/j.molimm.2015.06.019
- 876 69. Saeed S, Quintin J, Kerstens HHD, Rao NA, Aghajani-refah A, Matarese F, et al. Epigenetic
877 programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity.
878 *Science.* 2014;345: 1251086. doi:10.1126/science.1251086
- 879 70. Ifrim DC, Quintin J, Joosten LAB, Jacobs C, Jansen T, Jacobs L, et al. Trained immunity or
880 tolerance: opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of
881 various pattern recognition receptors. *Clin Vaccine Immunol CVI.* 2014;21: 534–545.
882 doi:10.1128/CVI.00688-13

883

II.2.4 Résultats supplémentaires

II.2.4.1 Le pré-traitement des macrophages bovins avec des extraits enrichis en BG amplifie leur réponse au LPS

Après l'observation des effets des BG chez la souris, nous avons cherché à savoir s'ils étaient présents dans une autre espèce comme les bovins. Les macrophages issus de monocytes sanguins bovins ont été isolés et cultivés comme décrits précédemment (cf. [II.1.4.3](#)). Le protocole de stimulation des cellules est similaire à celui appliqué dans l'article 2. Brièvement, les boMDM ont été prétraités avec 100 µg/mL des différents extraits de *Sc* CW pendant 8 h. Au terme de cette incubation, les surnageants ont été éliminés et les boMDM ont été stimulés avec deux concentrations de LPS ultrapure (10 et 1 µg/mL) ou incubés en présence de milieu (Unstim) pendant 16 h (Figure II-6A) ou pendant 8 h (Figure II-6B). La cytokine TNFα a été quantifiée dans les surnageants obtenus après 16 h de culture selon la méthode utilisée en [II.1.4.3](#) (Figure II-6A). Parallèlement, l'expression de *Csf2* a été analysée par qPCR sur les ADNc issus des cellules préalablement traitées pendant 8 h avec les extraits, puis stimulées pendant 8 h avec du LPS. Les primers utilisés sont les suivants:

Csf2-5'-AGTTTGACTCCCAGGAACCAAC ; Csf2-3'-ATCATGGTCAAGGAGCCCATG.

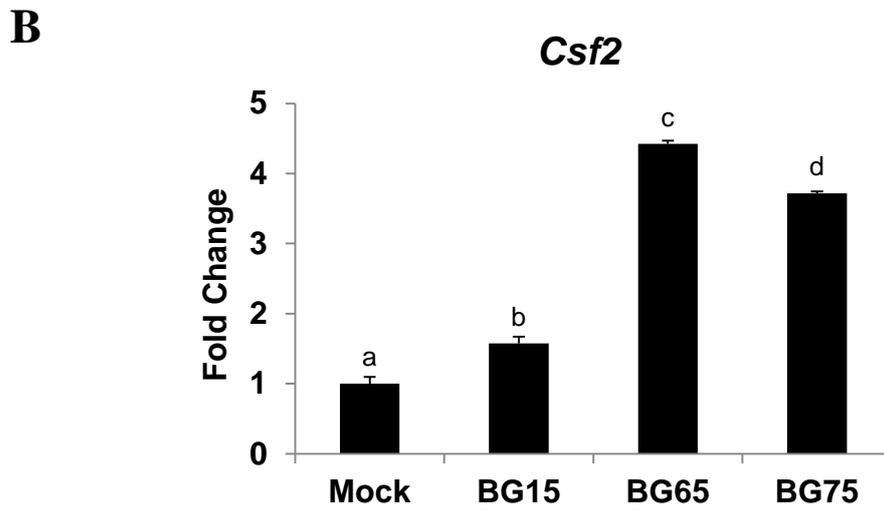
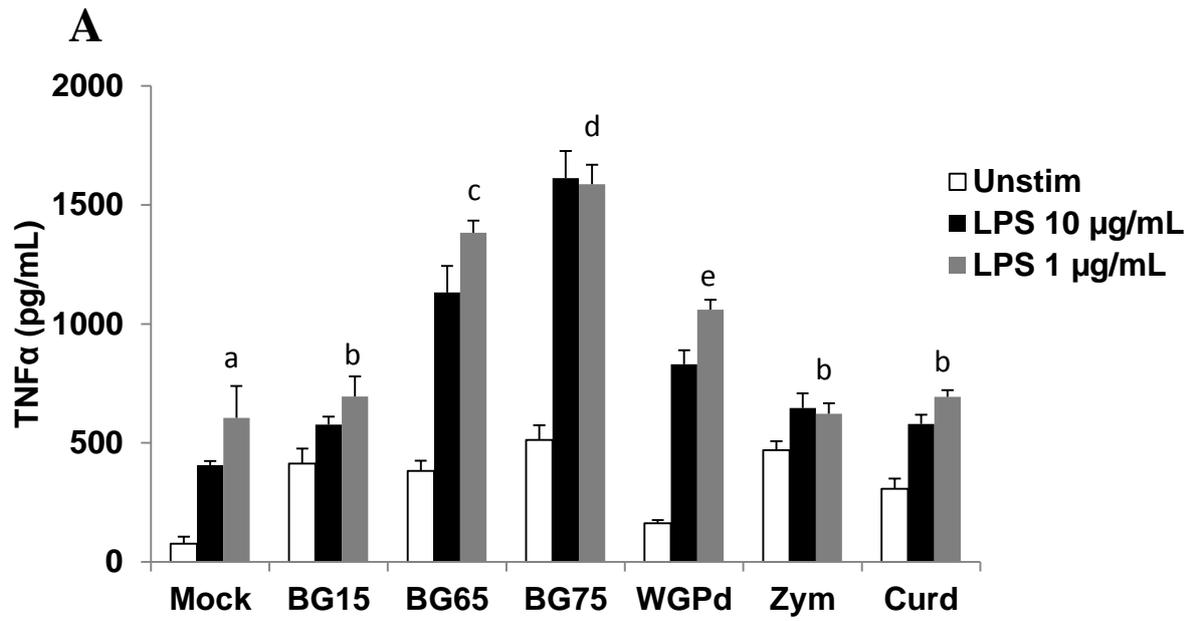


Figure II-6

De manière similaire aux BMDM murins, les BoMDM prétraités avec les extraits enrichis en BG, BG65, BG75 et dans une moindre mesure WGPd, ont une production de TNF α significativement plus grande par rapport à la condition sans prétraitement, et ce quelle que soit la concentration de LPS utilisée pour la seconde stimulation (Figure II-6A, *unpaired Student t-test*, $p < 0.05$). Néanmoins, il s'avère que la concentration de LPS à 1 $\mu\text{g/mL}$ produit une réponse légèrement plus intense pour toutes les préparations de BG testées. Par ailleurs, lorsque les cellules sont prétraitées avec des composés bruts (Zymosan ou BG15) ou même avec le Curdlan, la réponse cytokinique après un second stimulus est similaire à celle mesurée par les cellules non prétraitées et ne montre aucune synergie. De façon intéressante, les données regroupées sous le nom 'Unstim' sont comparables à celles présentées dans la Figure II-3 de la section [II.1.4.3](#), montrant les effets *per se* des différents extraits sur les boMDM.

Comme nous l'avons montré précédemment pour la souris dans la Figure 4A de l'article 2, les boMDM prétraités avec BG65 et BG75 expriment le gène *Csf2* codant le GM-CSF (FC>3.5 et FC>4, respectivement, par rapport à la référence sans prétraitement Mock, *unpaired Student t-test*, $p < 0.05$), alors qu'une incubation préalable avec BG15 n'induit qu'une expression de faible intensité de ce gène (FC=1.5 par rapport à Mock) (Figure II-6B).

II.2.4.2 Le profil d'expression des gènes montre que les extraits enrichis en BG amplifient la réponse inflammatoire induite par l'exposition à un ligand TLR

La Figure 3 de l'article 2 présente les résultats d'une analyse transcriptomique sur des cellules préalablement traitées avec les différentes préparations de BG, puis stimulées par le LPS, un ligand de TLR4, pendant 4 h ou 8 h. Dans cette figure, les résultats obtenus au moyen de la puce, qui sont présentés ici en Figure II-7 ont été confirmés sur des échantillons indépendants par RT-qPCR à haut débit (Biomark Fluidigm): Le panel C reprend la liste des 12 gènes les plus différemment exprimés dans la condition avec BG75 après 8 h de prétraitement et 8 h de stimulation avec le LPS ; chaque condition est comparée à la condition contrôle, *i.e.* les cellules non pré-traitées.

La Figure II-7 ci-dessous illustre les résultats obtenus avec la puce ; les données sont présentées dans la Table S1 de l'article 2. Les données sont exprimées en facteur de variation de l'expression et contiennent les 20 gènes les plus différemment exprimés à la suite du prétraitement avec par BG75 par rapport à la référence correspondant aux cellules qui n'ont pas reçu de prétraitement avant la stimulation avec le LPS.

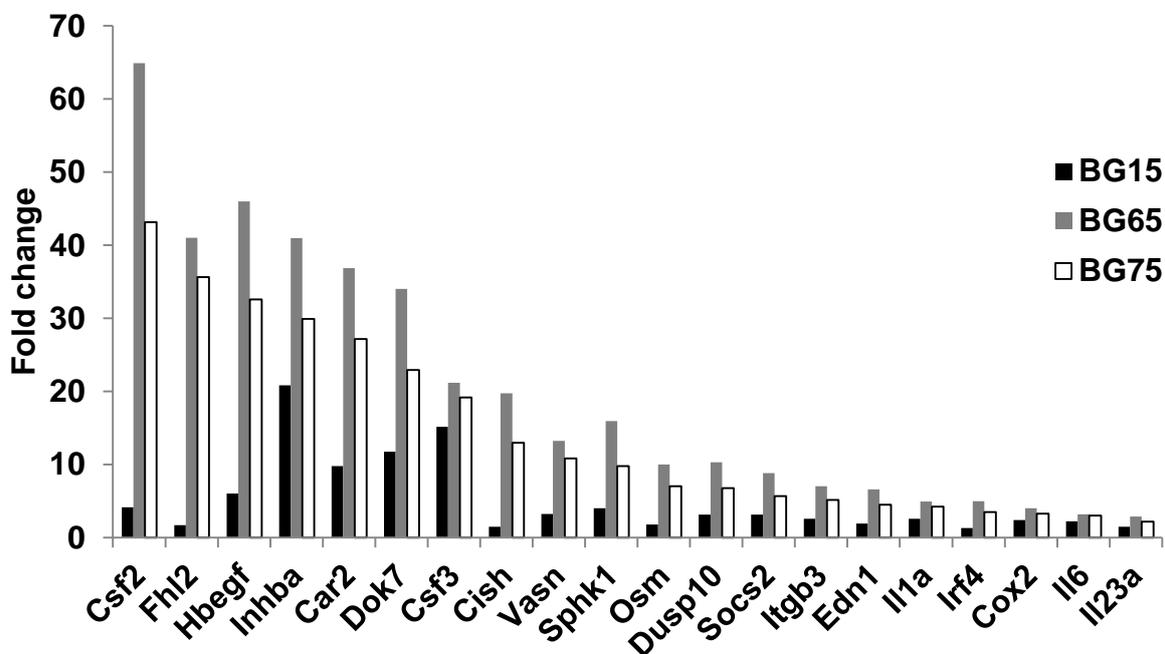


Figure II-7

Ces résultats montrent que *Csf2* et *Fhl2* sont les 2 gènes les plus fortement activés par un prétraitement avec BG65 et BG75, alors qu'ils ne sont pas exprimés dans la condition avec BG15.

Il faut noter que *Cish*, un inhibiteur de la production de cytokines dont l'expression peut être induite par *Csf2*, est également fortement induit. Ces trois gènes constituent un groupe de gènes qui sont spécifiquement activés en réponse au prétraitement avec les BG.

Par ailleurs, certaines cytokines présentes dans cette figure sont exprimées en conséquence de l'activation de différentes voies de signalisation connues pour être activées par l'engagement de Dectin-1, ou de la collaboration de Dectin-1 et avec un TLR. Il s'agit notamment de l'IL-6 via NFκB ou encore IL-23A et Cox-2 sous le contrôle des voies NFAT et MAPK.

De façon cohérente, les profils d'expression des gènes analysés selon les deux méthodes et sur deux séries d'échantillons différents, mettent en évidence l'activation de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, dans la croissance et la prolifération cellulaires, et dans l'interaction avec leurs récepteurs de cytokines favorisant la communication cellulaire et mettant en jeu des voies de signalisation diverses incluant les MAPK et les voies JAK-STAT (cf. Article 2).

Article 3

**Oral administration of *Saccharomyces cerevisiae*
 β -glucans improves immuno-responsiveness
against *Escherichia coli* systemic or local
infection in mouse**

En préparation

II.3. Administration des BG à la souris et effets sur la réponse à l'infection

II.3.1 Contexte et objectifs

Comme nous l'avons vu précédemment dans la revue bibliographique, les BG sont connus pour leur capacité à induire une réponse protectrice en situation infectieuse notamment vis-à-vis d'infections bactériennes ou fongiques [6,342]. Le potentiel immuno-stimulant des BG leur provient de leur rôle dans l'activation des leucocytes et notamment des neutrophiles et des macrophages pour la phagocytose, la bactéricie ou l'explosion respiratoire amplifiée par la réponse Th1 [378]. Malgré leur implication dans les processus antibactériens ou antifongiques, les mécanismes par lesquels les BG exercent leurs effets protecteurs demeurent mal connus malgré l'intérêt croissant dont ils font l'objet. La signalisation de la voie Dectin-1, le principal récepteur des BG, est largement influencée par leur structure mais surtout par le degré de pureté des préparations utilisées dans les essais comme nous l'avons montré dans l'article 1 [422]. En effet, dans cet article, nous avons montré qu'à la différence des extraits bruts de paroi, les BG enrichis issus de *Sc* ne sont pas capables d'induire la production de cytokines par les macrophages *in vitro* ; la forte activation des BMDM suite à l'incubation avec les extraits bruts de paroi résulte de l'interaction des autres composants de la paroi avec les PRRs exprimés par les macrophages. D'autre part, la voie d'administration des BG pourrait également influencer la réponse immunitaire induite. Les effets systémiques des BG délivrés par voie intrapéritonéale ou intraveineuse (sous forme soluble) ont été décrits dans la littérature [423,424]. En revanche, l'efficacité biologique des BG administrés par voie orale reste controversée et trop peu décrite. Néanmoins, certaines études ont mis en évidence des effets bénéfiques tels que l'amélioration de l'activité microbicide ou de la résistance aux infections systémiques chez les rongeurs ayant reçu des BG par voie orale [425–427]. La première question repose sur le devenir des BG dans le tractus digestif après ingestion et l'absorption des BG par les cellules de la muqueuse intestinale. Une étude a montré que les BG sont pris en charge par les cellules M pinocytaires puis par les cellules immunitaires des plaques de Peyer au sein de l'iléon, les particules de BG étant ensuite acheminées vers les organes lymphoïdes et la moelle osseuse [241].

La disponibilité de ces produits notamment leur absorption à travers la muqueuse intestinale conditionne leur potentiel immuno-modulateur et la protection ultérieure de l'hôte vis-à-vis des infections.

A titre d'exemple et afin d'explorer les conditions d'une future utilisation, l'administration des BG par voie orale à titre préventif contre les infections de la glande mammaire est un réel enjeu, compte tenu de l'importance de ces infections dans les élevages bovins laitiers et de leurs conséquences économiques [428].

L'objectif principal de cette étude était de déterminer les effets d'un traitement oral administré à titre prophylactique. Pour cela, le BG65, composé de paroi de *Sc* enrichi en BG, a été administré à des souris avant leur infection par *Escherichia coli* P4 ou SP15 par la voie intra-péritonéale ou intra-mammaire.

II.3.2 Article 3

1 **Oral administration of *Saccharomyces cerevisiae* β -glucans improves immuno-**
2 **responsiveness against *Escherichia coli* systemic or local infection in mouse**

3

4 Sarah Walachowski^{1,2}, Thomas Sécher³, Koen Breyne^{4*}, Céline Cougoule^{5*}, Evelyne
5 Meyer⁴, Gilles Foucras^{1,2}, Guillaume Tabouret^{2, 1‡}

6

7 ¹ Université de Toulouse, INP-ENVT, UMR 1225, IHAP, Toulouse, France

8 ² INRA, UMR1225, IHAP, Toulouse, France

9 ³ INRA, USC 1360, Toulouse, France ; INSERM, UMR 1043, Toulouse, France ; CNRS,

10 UMR 5282, Toulouse, France

11 Université de Toulouse, UPS, Centre de Physiopathologie Toulouse Purpan (CPTP),

12 Toulouse, France

13 ⁴ Department of Pharmacology, Toxicology and Biochemistry, Faculty of Veterinary

14 Medicine, Ghent University, Merelbeke, Belgium

15 ⁵ CNRS, Institut de Pharmacologie et de Biologie Structurale (IPBS), Department of

16 Tuberculosis and Infection Biology, Toulouse, France

17 Université de Toulouse; Université Paul Sabatier, UPS, IPBS, Toulouse, France

18

19 ‡ *Corresponding author*

20 g.tabouret@envt.fr (GT)

21 **Abstract**

22

23 **Keywords**

24 *Saccharomyces cerevisiae*; β -glucans ; infection ; *Escherichia coli* ; inflammatory response ;
25 immuno-modulation

26

27 **Abbreviations**

28 BG, β -glucan ; CW, cell wall; *Ec*, *Escherichia coli*; IM, intra-mammary; IMI, Intra-Mammary
29 Inoculation; i.p., intra-peritoneal; i.v., intravenous; MG, Mammary Gland; PAMP, pathogen-
30 associated molecular receptor; p.i., post-infection; PRR, pattern recognition receptor; *Sc*,
31 *Saccharomyces cerevisiae*; WT, wild type

32

33 **Introduction**

34 β -glucans (BG) are known for their ability to trigger protective immune responses in a variety
35 of challenges including fungal and bacterial infections [1,2]. They belong to a heterogeneous
36 group of polysaccharides that consists of a backbone of $\beta(1,3)$ -linked β -D-glucopyranosyl
37 units with or without $\beta(1,6)$ -linked side chains of varying length and distribution [3]. BG are
38 the major structural components of fungal cell walls including yeast, but also of some
39 bacteria, plants and algae, as reviewed by Volman [4]. According to the source, BG exhibit
40 differences in the type of linkage and branching that can influence their biological activities
41 [5,6]. As well, solubility, molecular mass, tertiary structure and degree of branching can vary
42 among BG allowing alteration of their immune modulating effects. The manufacturing
43 process and the isolation method also impact the structure of BG, explaining why BG from
44 the same source trigger opposite cellular response and even more when the purity levels are
45 not determined (reviewed in [7]).

46 The immuno-modulating potential of BG has been attributed to their ability to prime and
47 activate leucocytes. Neutrophils and macrophages in particular are thought to be crucial in
48 host defense to fungi and bacteria via phagocytosis, killing of invading organism and
49 respiratory burst through the induction of Th1-like immune response [8]. Despite the
50 importance of both BG, as immune enhancers and, leucocytes as immune response
51 orchestrators, the mechanism by which the cells recognize the BG and are able to trigger
52 protective effects on host during infections improved recently [9]. Indeed, it was previously
53 reported that particulate BG may exert their biological effects through Dectin-1, their main
54 leucocyte receptor expressed by macrophages, monocytes, dendritic cells, neutrophils and a
55 subset of T cells but not by NK cells [10,11]. Dectin-1 signaling induced numerous cellular
56 responses in dendritic cells and macrophages [12–18]. While Dectin-1 is the dominant

57 phagocytic receptor of BG in macrophages [10], this function seems to be assumed by CR3
58 on neutrophils [19].

59 However, considering the limited purity and the poor characterization of BG used in most
60 studies, the ability of BG to directly trigger cytokine synthesis in macrophages is questioned.
61 In a previous study, we showed that BG-enriched extract of *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*)
62 cell wall (CW) was not able to induce cytokine production by bone marrow-derived
63 macrophages (BMDM) compared to crude extract of the same strain or zymosan, another
64 well-known crude yeast compound [20]. In addition, the strong activation of BMDM by crude
65 compounds was not related to their BG content but resulted from interaction of the other cell
66 wall components with PRRs expressed by leucocytes including TLRs. Indeed, the
67 collaboration between Dectin-1 and TLRs was extensively described in the literature [21,22].

68 Another interesting fact is whether the route of administration influences the immune-
69 modulatory properties of BG. Whereas systemic effects of BG (i.v. or i.p.) are well
70 documented [23,24], efficiency of orally administrated BG is still controversial or poorly
71 reported [25]. Indeed, some studies described improved microbicidal activities and resistance
72 to systemic infections in rodents following BG oral supplementation [25–27]. Meanwhile, it
73 was recently established that uptake of BG particles was mediated by pinocytotic microfold
74 (M)-cells and then by immune cells of Peyer's patches located in the intestine [4,28].

75 Orally delivered *Sc* BG could be promising candidates to mediate protective response in
76 bacterial infections. As a model, mice were orally administrated with particulate β -glucans
77 derived from *Saccharomyces cerevisiae* to determine their effects on the outcome of systemic
78 (intraperitoneal challenge) or local infections such as intra-mammary infections that
79 recursively affect lactating animals and cause major economic losses in dairy cattle [29].
80 Using two *Escherichia coli* strains, we evidenced that BG-enriched oral treatment lowered the
81 strong inflammatory response induced by these bacteria, protected from organ injury and

82 controlled the locally administrated bacterial dissemination in murine model of *E. coli*
83 mastitis or peritonitis. Taken together, our results underlined the potential role of BG as
84 immune-modulators in mammary gland infections.

85

86 **Materials and Methods**

87 **Reagents**

88 RPMI 1640 GlutaMAX™, DMEM GlutaMAX™, PBS, Non-Essential Amino Acids
89 (NEAA), sodium pyruvate and antibiotics for cell culture such as Penicillin-Streptomycin
90 (Pen-Strep™) and Gentamicin™ were purchased from GIBCO (Life Technologies). Fetal
91 Bovine Serum (FBS) was provided by Eurobio, France. UltraPure lipopolysaccharide (LPS)
92 from *E. coli* O111:B4 was purchased from InvivoGen (France). For mammary cells isolation,
93 collagenase type IV was purchased from Worthington and Percoll from Sigma.

94 **Ethics statement**

95 All intraperitoneal animal experiments were performed the National Veterinary College
96 (Toulouse, France) and in accordance with Federation of European Laboratory Animal
97 Science Association guidelines (FELASA). These experiments were performed by FELASA
98 accredited investigators (n° 311155580). Mice were housed in an accredited research animal
99 facility of the National Veterinary College (Toulouse, France) that is fully staffed with trained
100 husbandry, technical, and veterinary personnel. Every effort was made to minimize animal
101 suffering and distress.

102 Intra-mammary experiments were performed at the Ghent University and were carried out in
103 strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory
104 Animals of the National Institutes of Health. The protocol was approved by the Committee on

105 the Ethics of Animal Experiments of the Ghent University. All efforts were made to minimize
106 animal pain and distress.

107 **Preparation and administration of β -glucans**

108 BG compounds of interest were extracted from the same strain of *Saccharomyces cerevisiae*
109 (*Sc*) owned by Phileo-Lesaffre Animal Care. As previously published [20], β -glucans were
110 purified from *Saccharomyces cerevisiae* cell wall by hot alkaline extraction (4% NaOH,
111 90°C, 2 h) to remove mannoproteins and lipids and was then lyophilized (94% dry matter).
112 Beta-glucan (1,3)(1,6) purity (65%) named BG65 was determined using the enzymatic yeast
113 beta-glucan kit (K-EBHLG, Megazyme, Ireland) and the total amount of glucose released was
114 measured by HPLC (see Table 1 for the full composition analysis).

115 **Table 1: Main composition of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall compound BG65**

Yeast Cell Wall Preparation	
Constituents	BG65
Dry matter (%)	95.8
Beta-glucans (%)	67.1
Glycogen (%)	13.0
Mannans (%)	3.7
Total glucans (%)	69.1
Proteins (%)	3.4

116
117 This BG preparation was suspended in sterile D-PBS and delivered orally using rigid dosing
118 cannula at 3 mg/mouse/day, every day for 14 days. Food and water were left ad libitum for
119 the duration of the experiments. The sham-dosed group of mice received a same volume (200
120 μ L) of sterile D-PBS with a similar time schedule. After this force-feeding period, mice were
121 infected as described above either intraperitoneally or intramammarily.

122 **Bacterial strains culture and inoculum preparation**

123 *Escherichia coli* strain SP15 is an extra-intestinal pathogenic *E. coli* strain (ExPEC) of
124 serotype O18:K1:H7 isolated from neonatal meningitis. *E. coli* P4 strain (O32:H37) was
125 isolated from a clinical mastitis in cow and is now considered as a reference strain [30]. Both
126 strains were cultured overnight at 37°C with rotary shaking (200 rpm) in LB medium. Sub-
127 cultures were initiated by diluting 1/100 overnight culture in LB and further grown for 3
128 hours. Optical density was measured at 600 nm and concentration adjusted at 1×10^8
129 bacteria/mL. Colony forming units (CFU) numbers were determined by plating serial
130 dilutions on LB agar.

131 For intramammary inoculation, *E. coli* P4* strain (O32:H37) expressing mCherry was used.
132 One day prior to the inoculation, bacteria were grown 5 h at 37°C in Brain Heart Infusion
133 (BHI) medium under agitation. A 1/100 dilution of the preculture was further grown in BHI
134 overnight at 37°C. After centrifugation and two washing steps, bacteria were resuspended and
135 diluted in sterile PBS, and then adjusted to 1×10^4 CFU/mL using a standard curve plotting
136 CFUs as a function of absorbance at 600 nm. The number of CFUs actually injected was
137 confirmed by plating the inoculum onto an agar plate and counting the CFUs after overnight
138 incubation.

139 **Mouse strains and infection model**

140 For intraperitoneal experiments, wild type C57BL/6J, specific pathogen free (SPF status), 8-
141 to 12-week-old female mice were purchased from Janvier Labs (St Berthevin, France).

142 For intra-mammary experiments, female albino NFκB luc mice were kindly provided by Pr.
143 Evelyne Meyer (Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of
144 Ghent, Belgium). Genetically, these mice are heterozygous for the NFκB luc transgene in a
145 Tyr^{-/-} C57Bl/6 background and thus easier to visualize for in vivo imaging purposes than
146 Tyr^{+/+} animals. These mice were compared with wild type (WT) C57BL/6 mice also

147 provided by Evelyne Meyer. All mice were conventionally housed with water and food ad
148 libitum, and maintained with light/dark cycles of 12 hours per day. Pathogen-free conditions
149 were routinely insured by screening sentinels. Surgery was performed under isoflurane
150 anesthesia 1.5L/min O₂ combined with ketamine and xylazine containing cocktail that was
151 intraperitoneally administrated prior to anesthesia

152 **Intraperitoneal infections**

153 1×10^5 CFUs diluted in sterile D-PBS were intraperitoneally-injected per mouse. Mice were
154 sacrificed at 0, 4, 8, 12 and 24 h after challenge and peritoneal washes were performed with 5
155 mL of sterile D-PBS containing 2mM EDTA and 5% heat inactivated fetal calf serum (FCS).
156 Peritoneal exudates were then centrifuged (300g, 4°C), peritoneal cell pellet was processed
157 for flow cytometry analysis and supernatant stored at -20°C for cytokine quantification. Liver
158 and spleen were collected and for each organ a piece of tissue was fixed in 10% formalin
159 solution for further histological examination and a piece was mechanically dissociated
160 (ribolysis) for CFU determination by serial diluting tissue homogenates and plating on
161 MacConkey agar.

162 **Intra-mammary infections (IMI)**

163 Eight week old WT or transgenic mice were coupled to 10-week old male. Following
164 parturition, the pups were weaned after 10 days to enhance mammary gland (MG)
165 development. One hour after weaning, mice were intramammarily injected with 100 μ L of
166 BG65 (1 mg/mL) or PBS in fourth gland pair (R4 and L4) under inhalational anesthesia.
167 Briefly, the teats and its surrounding area were disinfected with sterile compress soaked in
168 chlorhexidine solution. While maintaining lightly the teat with pliers near the apex, the 32-
169 gauge blunt needle mounted on a syringe was gently inserted through the canal and the
170 corresponding volume was slowly delivered. For single IMI, the procedure of injection ended
171 at this stage. For double IMI, a second challenge with 100 μ L of bacteria inoculum occurred 4

172 h after in R4 and L4. In the case of a single IMI following the oral treatment, the mice were
173 directly challenged with inoculum or PBS. Twenty-four hours after BG IMI, or twenty hours
174 after bacterial challenge, mice were sacrificed by cervical dislocation and the inoculated
175 glands were isolated and plated for ex vivo imaging before mammary gland digest.

176 **Histological examination and in vivo/ex vivo biomaging**

177 For histological examination, fixed tissues (fixed in formalin for 24 h then embedded in
178 paraffin) were subjected to standard hematoxylin and eosin staining.

179 Imaging of luciferase activity and neutrophil influx in intramammary injected mice was
180 performed with the IVIS lumina II (Caliper). To visualize the NF κ B signal, a suspension of
181 D-luciferin (2 mg/100 μ L) dissolved in PBS was injected in the abdomen (right and left) of
182 transgenic mice previously anesthetized by isoflurane. In vivo NF κ B imaging was performed
183 10 minutes after injection of luciferin. The transgenic mice were measured before (-2 h) and
184 kinetically after IMI (at 6 h, 8 h and 24 h) for N=3 mice to establish the optimal time point of
185 NF κ B activity measurement and for all remaining experiments at 8 h post-IMI. The injected
186 luciferin is oxidized with ATP by the transferase produced in case of NF κ B activation, which
187 leads to a bioluminescent light signal. The intensity of the bioluminescent signal provided by
188 the living image software 3.2 is correlated with the level of NF κ B activity.

189 For the neutrophil influx determination, a solution of luminol was injected in the fifth gland
190 (R5 and L5) of both transgenic and WT mice under isoflurane-anesthesia. After 2 min of
191 incubation, in vivo neutrophils influx was imaged. The bioluminescent light signal given by
192 the software was relevant of the bactericidal activity of neutrophils in mammary glands. At 24
193 h post BG-IMI, mice were sacrificed and glands harvested to visualize ex vivo through
194 imaging. All the imaging data are provided as average radiance expressed in
195 photons/second/cm²/sr that represents the photon emission from the tissue surface.

196 **Isolation of mammary leucocytes**

197 Right after the imaging, lymph nodes were carefully removed from the MG (L4 and R4) that
198 were immediately placed into cold PBS. MGs were weighed and homogenized using
199 McIlwain chopper. MG homogenates were resuspended in 0.1% collagenase type IV freshly
200 diluted in RPMI and then incubated for 30 min at 37°C under agitation. The resultant
201 suspension was pelleted, resuspended in 40% Percoll, layered on 80% Percoll and finally
202 centrifuged at 1000 g for 30 min at 15°C. The gradient interface constituted by MG
203 leucocytes was carefully collected and washed in 5% FCS supplemented-PBS. MG leucocytes
204 were then resuspended in cold 0.2 µm filtered-FACS Buffer containing PBS, 1% bovine
205 serum albumin (BSA), 2.5 mM EDTA and 0.01% sodium azide. Number of isolated
206 leucocytes and dead cells were determined using flow cytometry. For further analysis, 2x10⁵
207 cells per MG were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) solution in PBS for 10 min. After
208 PBS washing steps, MG leucocytes were stored in PBS at 4°C until analysis.

209 **Flow cytometry**

210 Proportion of neutrophils in bone marrow along the infection was characterized using flow
211 cytometry. A Three color combination: Ly6G-FITC (1A8, Biolegend), Ly6C-PE (HK1.4,
212 Biolegend) and F4/80-APC (CI:A3-1; AbD serotec) were used to identify neutrophils,
213 resident macrophages and inflammatory monocytes. Before staining, cells were incubated
214 with FcBlock reagent (anti-CD16/CD32, Biolegend, Ozyme-France) to block FcγRII/III
215 receptors. At analysis, doublets and dead cells, labeled with 7-AAD (Biolegend, Ozyme-
216 France), were excluded. All samples were acquired using a MACS Analyzer (Miltenyi Biotec,
217 Germany) flow cytometer and analyzed with FlowJo software (TreeStar, USA).

218 Mammary cells that were previously fixed in 4% paraformaldehyde were also pre-incubated
219 with FcBlock (2.4G2, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's recommendations.
220 Then they were labelled with the following fluorochrome conjugated mAbs: anti-CD45-
221 PECy7 (I3/2.3; Southern Biotech) or its isotype control IgG2b; Anti-Ly6G-FITC (1A8,

222 Miltenyi Biotec) or its isotype control IgG2a and anti-F4/80-APC (CI:A3-1; AbD serotec) to
223 identify leucocytes, neutrophils and macrophages, respectively. At analysis, doublets, red
224 blood cells and lymphocytes were excluded based on CD45 staining. All samples were
225 acquired using a CytoFLEX (Beckman Coulter, USA) flow cytometer and analyzed with
226 CytExpert software (Beckman Coulter, USA).

227 **TNF α quantification**

228 The concentrations of TNF α in peritoneal exudates were determined by ELISA as
229 recommended by manufacturer (Biolegend, Ozyme, France).

230 **Statistical analysis**

231 All experiments were repeated on independent individuals and data are expressed as the
232 mean \pm SEM of the values from all of them. For intraperitoneal infections, statistical
233 significance was assessed using a two-tailed unpaired *Student's t-test* with a threshold set at p
234 < 0.05 . Mean values shown with different letters on plots are significantly different.
235 For intramammary experiments, graphing and statistical analyses were done using GraphPad
236 Prism 5 (San Diego, CA, USA). P-values of normal distributed data were calculated by one-
237 way ANOVA testing. Mean values were then compared by Newman-Keuls Multiple post hoc
238 comparison with a threshold set at p < 0.05 . If necessary, normalization occurred through
239 log₁₀ transformation. When only 2 groups were compared, median values were compared
240 with non-parametric statistics (unpaired two-tailed *t-test*).

241 **Results and discussion**

242 **Oral BG treatment dampens tissue damage and bacterial**

243 **development in mice upon *E. coli* peritoneal challenge**

244 We first focused our interest on the ability of *E.coli* to colonize the tissues in mice that were
245 orally administrated by BG65 or PBS. CFU counting was performed in organs that are oftenly
246 the target of bacterial dissemination and multiplication, the liver and the spleen, at 4, 8, 12
247 and 24 h post-infection. When comparing bacterial growth in liver and spleen of BG65- and
248 PBS- orally treated mice, a significantly higher number of CFU was counted for each selected
249 time points for PBS treatment except at 4 h p.i. (Figures 1A and 1B). This means that BG65
250 oral treatment can prepare immune cells for improvement of the response, and trigger an
251 antibacterial response after 4 to 8 h post-infection. In line with this hypothesis, BG65-
252 treatment induced a relevant and grading drop of the bacterial expansion in the spleen and the
253 liver resulting in low amounts of bacterial charge after 24 h of infection. However, in the PBS
254 condition, while we observed a reduction of CFU counting at 12 h p.i., the bacterial charge
255 was significantly higher at 24 h p.i. in the liver and spleen, indicating the unrestricting growth
256 in mice that received PBS orally unlike BG65. Furthermore, there were more mice free from
257 *E. coli* in the BG65 group from 8 h p.i. until the end of the experiment as compared to the
258 PBS group (Figures S1A and S1B). Indeed, in this latter group, none of the mice was free of
259 *E.coli* at 4, 8, and 12 h p.i., and only a few individual mice eliminated the infection in the
260 spleen (1 out of 9) and in the liver (2 out of 9) at 24 h p.i. These data confirmed that BG65
261 facilitates an efficient antibacterial response in mice orally treated. In contrast, PBS-treated
262 mice seemed not to be able to control bacterial burden although the initiation of a strong
263 inflammatory response, more prejudicial for organs. Suzuki et al further reported that oral
264 administration of BG was associated with phagocytic activity and respiratory burst as well as

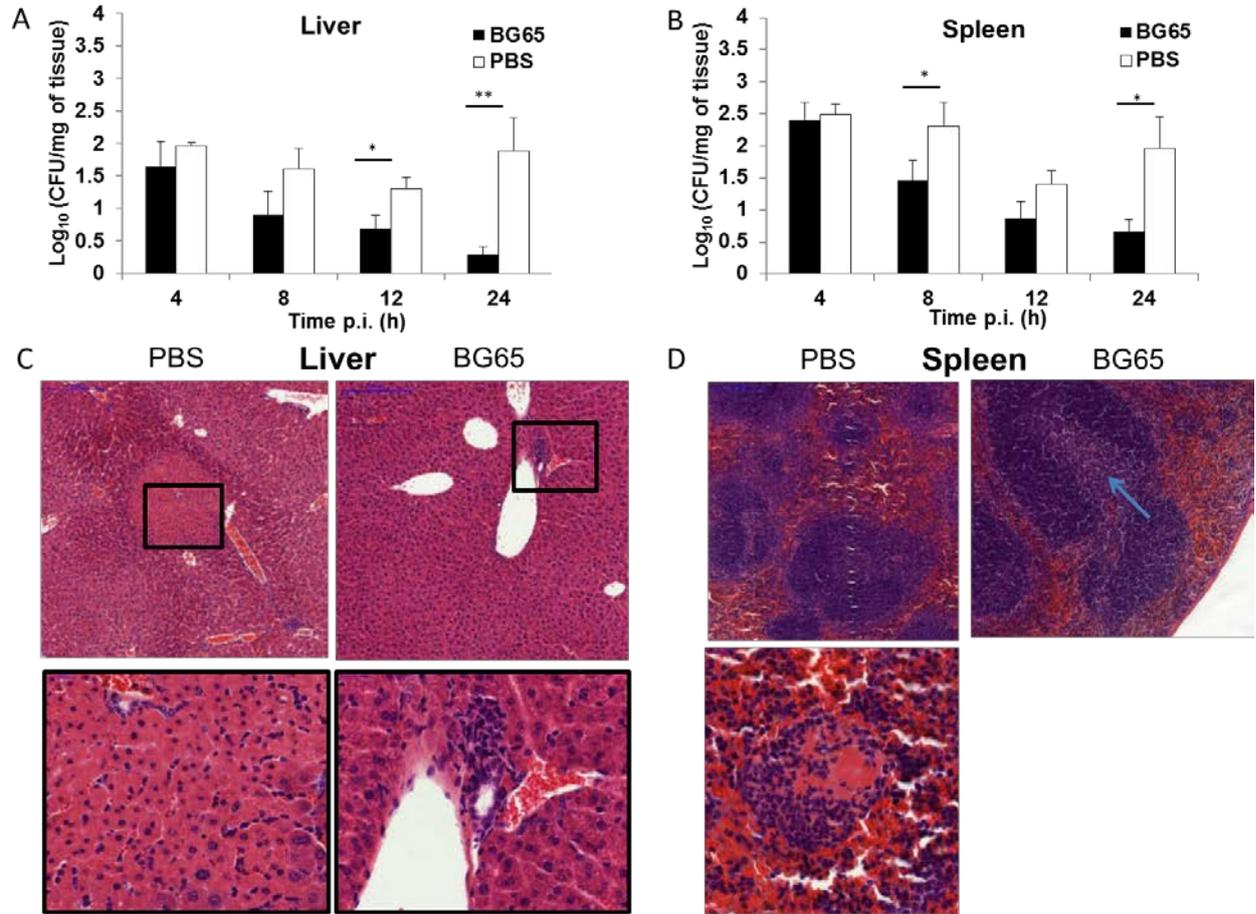


Figure 1

FIGURE 1. Oral BG-enriched treatment dampens tissue damaging and bacterial expansion in mice upon *E. coli* SP15 strain peritoneal challenge.

(A-B) At 4 h (N=5/group), 8 h (N=8/group), 12 h (N=10/group) and 24 h (N=9/group) post-i.p. infection with *E. coli* SP15 strain, liver and spleen were harvested from PBS- or BG65-orally treated mice and evaluated for bacterial growth. Data are expressed as mean \pm SEM ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, Student's *t*-test).

(C-D) Representative section of formalin-fixed and paraffin-embedded liver (C) and spleen (D) from PBS- or BG65- orally treated mice following 24 h of intraperitoneal inoculation of 1.10^5 CFU/mouse of SP15 strain of *E. coli*. Pictures illustrates large necrotic area with a few neutrophils (blue nuclei) in perivascular zone of the liver (Zoom of C) or with a number of PMN in the spleen (Zoom of D) in PBS-treated mice whereas BG65-treated liver and spleen are exempted of necrotic damages but still infiltrated of PMN granuloma in portal space (blue, zoom C) and with visible clear centers in the spleen white bulb (blue arrow, zoom D). See details in Table 2.

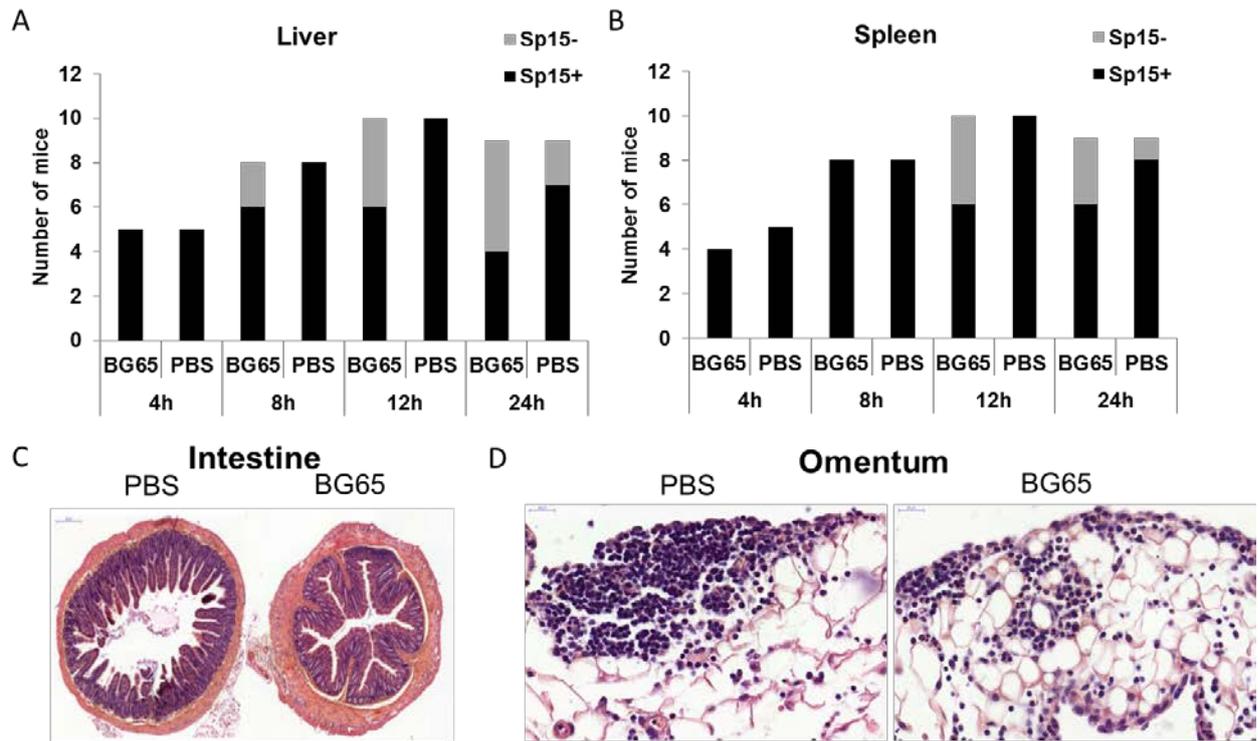


Figure S1

FIGURE S1. Oral BG-enriched treatment reduces inflammation and favors the bacterial clearance in mice following bacterial peritoneal infection.

(A-B) Representative section of formalin-fixed and paraffin-embedded intestine **(A)** and omentum **(B)** from PBS- or BG65- orally treated mice following 24 h of intraperitoneal inoculation of 1.10^5 CFU/mouse of SP15 strain of *E.coli*. Pictures illustrates the more intense recruitment of neutrophils (blue nuclei) into the omentum in PBS-treated mice compared to the BG65-treated mice **(B)**, but no differences of intestine morphology between both of the conditions **(A)**. **(C-D)** At 4 h (N=5/group), 8 h (N=8/group), 12 h (N=10/group) and 24 h (N=9/group) post-i.p. infection with *E. coli* SP15 strain, liver and spleen were harvested from PBS- or BG65- orally treated mice and evaluated for the bacterial growth. Data are expressed as the number of animal presenting live bacteria in their liver or their spleen.

265 IL-1 production in murine peritoneal macrophages [26]. Similarly, higher phagocytic and
266 oxidative activities were described in monocytes and neutrophils in rats following yeast BG
267 delivery [27].

268 Because BG65 was shown to improve responsiveness of peritoneal macrophages in vitro (data
269 to be published), we sought to evaluate the effects of BG65 oral administration on organ
270 injuries induced by an intra-peritoneal challenge with a pathogenic strain of *E. coli* in mice.
271 After 14 days of daily intake, mice were infected and then necropsied at 24 h post-infection to
272 analyze histology of the liver, spleen and omentum. As shown in the figure 1C, the liver of
273 mice orally treated with PBS was characterized by vast necrotic areas that presented two
274 kinds of damages. Necrotic ischemic-like areas in perivascular space contained a few
275 neutrophils, hepatic necrotic cells have small and dark blue nuclei and eosinophilic cytoplasm
276 (Zoom **A**, left). Livers from PBS -treated mice had rich neutrophil necrotic areas, mainly in
277 cortical sinus. In contrast, livers from mice orally delivered with BG65 were totally devoid of
278 necrosis but portal areas were infiltrated with numbers of neutrophils (blue) grouped in some
279 granuloma (Zoom **A**, right). Similarly to the liver, the spleen of mice that received PBS oral ly
280 exhibit extended areas of infectious necrosis that contained numbers of neutrophils (Zoom **B**,
281 left) that were freshly recruited or resulted from extramedullary granulopoiesis (Figure 1D).
282 In addition, no clear centers in the white pulp were clearly visible reflecting the low activation
283 of T lymphocytes and proliferation in the spleen of PBS-treated mice (Figure 1D, left).
284 However, BG65 oral treatment combined with *E. coli* challenge did not induce splenic
285 necrosis but activate lymphocyte proliferation as indicated by the frequency of clear germinal
286 centers (blue arrow) in the lymphoid follicles (Figure 1D, right). No alteration of the intestine
287 mucous membrane was identified in both experimental groups (Figure S1C).

288 Tissue damaging of the liver and spleen was classified according to several parameters
289 including the necrosis extent, the presence of granuloma and the levels of neutrophil

290 infiltration. Each parameter was evaluated according to a notation ruled as absence (-),
291 moderated (+), marked (++) or severe (+++), and the number of mice presenting the
292 histological characteristics at this degree was reported in Table 2. PBS treated-mice were
293 mainly and markedly affected by hepatic and splenic necrosis as compared to their
294 counterparts fed with BG65 which were unaffected (Table 2). Similarly, liver and spleen
295 tissues in most PBS-treated mice were severely infiltrated with neutrophils whereas BG65
296 treated mice had only low or moderated neutrophil influx in both of these organs. However,
297 granulomas were more frequently formed in the liver of these mice.

298 We also analyze the histological features of the omentum, a peritoneal structure deriving from
299 the curvature of the stomach and the spleen, containing multiple immune cell aggregates
300 called milky spots. This highly vascularized parenchyma of fatty tissue has recently been
301 identified relevant in the control of septic peritonitis and the protection of digestive viscera
302 [31]. Omentum from BG65-treated mice seemed to be less infiltrated by neutrophils
303 compared to PBS-delivered mice (Figure S1D). Furthermore, in PBS condition, milky spots
304 were more extended and signs of tissue disorganization characterized by the partial loss of
305 alveolar structure were apparent (Figure S1D, left).

306 Our results showed that tissue damages linked to the inflammation in liver, spleen and also in
307 the omentum following *E.coli* challenge were more marked and more frequent in mice that
308 received PBS orally as compared to mice orally administrated with BG65. This suggests that
309 BG65 could have protective effects against over inflammation occurring after bacterial
310 infection. This is in line with the observations of Sandvik et al who reported reduced hepatic
311 and liver injuries in rats following oral administration of soluble *Sc* BG and systemic LPS
312 challenge [32].

Table 2

Liver						
	Necrosis		Granulomas		PMN infiltration	
	<i>Intensity</i>	<i>Nbr of positive animals/total</i>	<i>Intensity</i>	<i>Nbr of positive animals/total</i>	<i>Intensity</i>	<i>Nbr of positive animals/total</i>
PBS	++	4/6	+/-	2/6	++	5/6
BG65	-	0/6	+	5/6	+/-	3/6

Spleen				
	Necrosis		PMN infiltration	
	<i>Intensity</i>	<i>Nbr of positive animals/total</i>	<i>Intensity</i>	<i>Nbr of positive animals/total</i>
PBS	+	3/6	++	5/6
BG65	-	0/6	+	3/6

313 Furthermore, BG increased resistance to infections and improved survival rate in mice
314 systemically challenged with other pathogens including *Staphylococcus aureus* or *Candida*
315 *albicans* were previously reported [25].

316 **Oral BG-enriched treatment regulates the inflammatory response** 317 **triggered by an intraperitoneal bacterial challenge.**

318 Using the same model of peritonitis in mice that received BG65 or PBS, we assessed the
319 intensity of the inflammatory response triggered by the intraperitoneal injection of *E.coli*
320 SP15. The infecting bacteria triggered an inflammatory response characterized by intense
321 leucocyte recruitment into the peritoneal cavity. At 4, 8, 12 and 24 h p.i., the recruited
322 neutrophils and monocytes were analyzed by flow cytometry (Figures 2A and 2B). While
323 non-significant differences of the neutrophil numbers were identified at 4, 8 and 12 h p.i. in
324 both groups, the recruitment of neutrophils were suddenly doubled at 24 h p.i. in PBS-treated
325 mice linked to the recrudescence of the infection (Figure 2A). In contrast, in the BG65 orally
326 treated, the influx of neutrophils was leveled off at 24 h p.i.. Throughout the infection, a slight
327 increase of neutrophil number occurred at 8 h p.i. in BG65-treated mice and then tended to
328 decrease, whereas it remained stable until 12 h p.i. in the PBS group before rising
329 dramatically at 24 h p.i..

330 The number of recruited monocytes was significantly higher and earlier in the BG65 group
331 than in the PBS at each point of the time course (Figure 2B). Furthermore, the recruitment of
332 inflammatory monocytes was quickly heightened at 8 h p.i. in BG65-treated mice and was
333 maintained at 12 h and 24 h p.i.. Instead, in the PBS group, the number of inflammatory
334 monocytes was slightly increased at 8 h p.i. but started later at 24 h p.i.. The evolution of the
335 resident macrophages was also analyzed (Figure S2). As in a classical inflammatory response,
336 the number of resident macrophages gradually dropped in both BG65- and PBS- treated mice
337 until their disappearance at 24 h p.i.

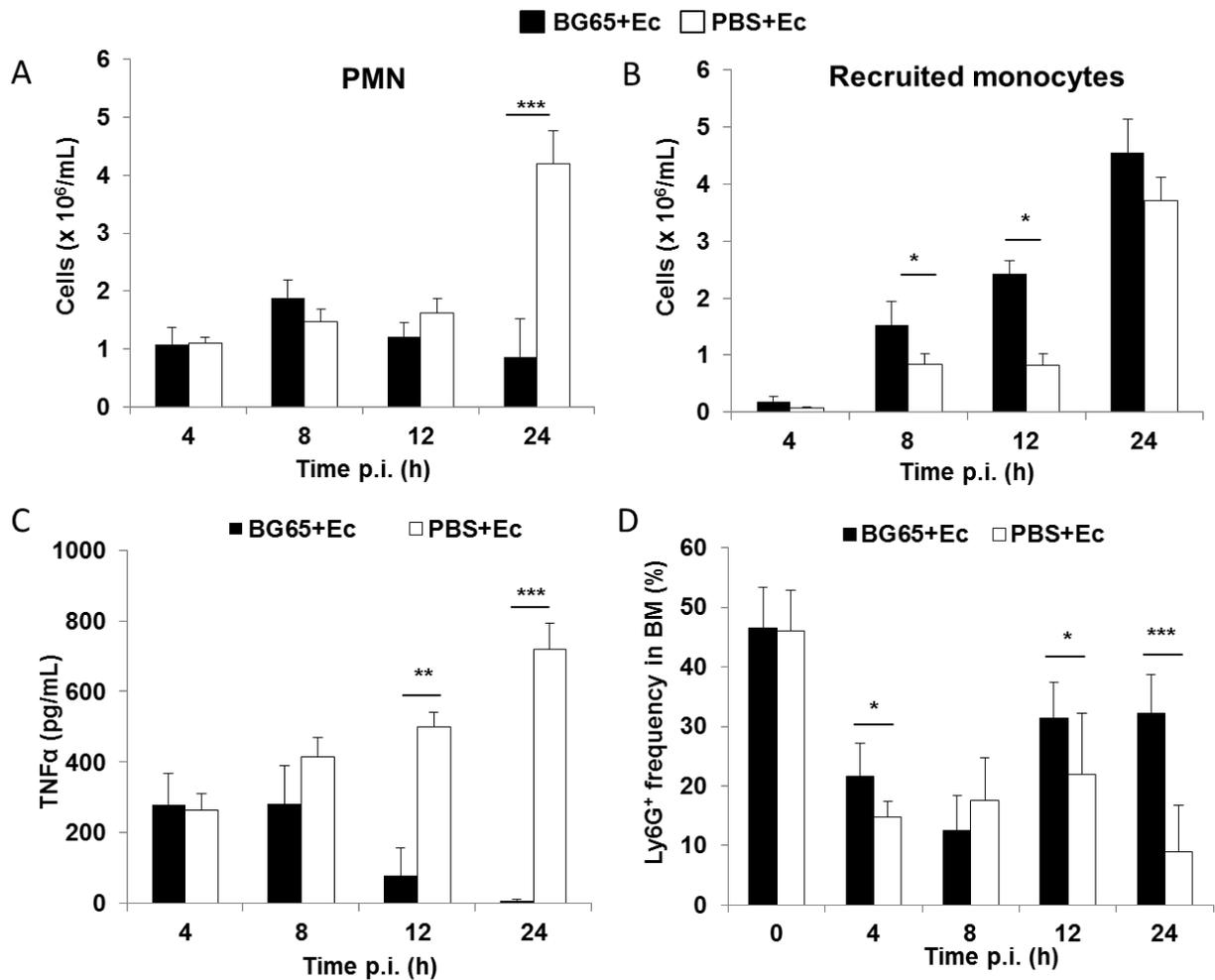


Figure 2

FIGURE 2. Oral BG-enriched treatment lowers the intensity of inflammatory response triggered by an intraperitoneal bacterial challenge.

C57Bl/6 mice were orally daily delivered with PBS or BG65 (3 mg/mouse) for 14 days orally and then submitted to intraperitoneal inoculation of 1.10^5 CFU/mouse of SP15 strain of *E. coli*. After 4 h (N=5/group), 8 h (N=8/group), 12 h (N=10/group) and 24 h (N=9/group) of incubation, peritoneal cells (A-B) or bone marrow cells (D) were collected and the number (A) or the proportion (D) of neutrophils and inflammatory Ly6C^{high} monocytes (B) were assessed by flow cytometry as described in Material and Methods section. Supernatants of peritoneal exudates were further assessed for TNFα quantification using ELISA (C). Data are presented as the mean ± SEM of individual mice measurements and are representative of two independent experiments (p<0.05 *, p<0.01 **, p<0.001 ***, Student's *t-test*).

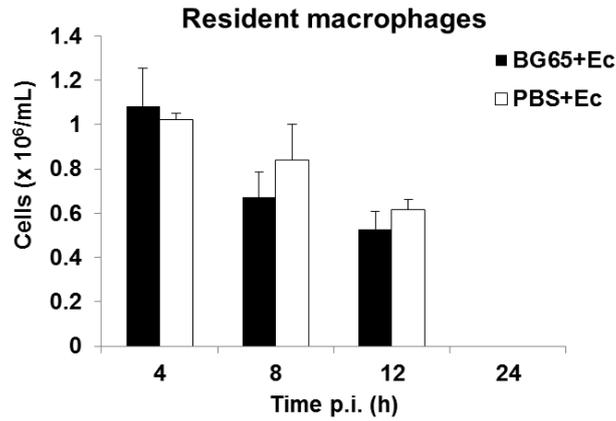


Figure S2

FIGURE S2. Intraperitoneal bacterial challenge induces the decrease and loss of F4/80^{high} resident macrophages number whatever the BG65- or PBS- oral treatment.

C57Bl/6 mice were orally daily delivered with PBS or BG65 (3 mg/mouse) for 14 days orally and then submitted to intraperitoneal inoculation of 1.10^5 CFU/mouse of SP15 strain of *E. coli*. After 4 h (N=5/group), 8 h (N=8/group), 12 h (N=10/group) and 24 h (N=9/group) of incubation, peritoneal cells were collected and the number of resident macrophages was assessed by flow cytometry as described in Material and Methods section. Data are presented as the mean \pm SEM of individual mice measurements and are representative of two independent experiments ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, Student's *t*-test).

338 These data evidenced the alterations of the inflammatory response in BG65-treated mice
339 consequently to a bacterial infection. BG65 induced a moderated recruitment of neutrophils
340 and an early and strong monocytes influx as compared to PBS-treated mice, which
341 contributed to the local elimination of the bacterial burden and to the regulation of neutrophil
342 recruitment.

343 We further characterized the production of pro-inflammatory TNF α in supernatants of
344 peritoneal exudates. In line with the previous results, in comparison with BG65-treated mice
345 group, there was a high production of TNF α from 8 h p.i. until 24 h p.i. in PBS-treated mice
346 (from 250 pg/mL at 4 h p.i. to 700 pg/mL at 24 h p.i.) (Figure 2C). In contrast, the amounts of
347 TNF α , which were similar at 4 h p.i. in both groups, decreased from 8 h p.i. peritoneal
348 exudates from BG65-treated mice and became barely detectable at 24 h p.i. These results
349 confirm the intensity of the inflammatory response triggered by *E.coli* intraperitoneal
350 challenge, that was regulated in BG65-treated mice.

351 The severity of peritonitis including the intense neutrophil recruitment in the peritoneal cavity
352 occurring in the PBS group was also evidenced in the bone marrow (BM) due to the
353 neutrophil export to the blood. Indeed, neutrophils result from differentiation of granulocytes
354 progenitors in the BM, and are quickly mobilized during infectious processes. We
355 investigated the neutrophil composition of the bone marrow at several time points in the same
356 experiment. As expected, the frequency of neutrophils in BM was significantly different
357 between BG65- and PBS-treated mice (Figure 2D). Indeed, at 4 h and 12 h p.i., there were
358 consistently less neutrophils in the BM of BG65-mice as compared to the PBS mice ($p < 0.05$),
359 and this difference was even more accentuated a 24 h p.i. As a result, BM of PBS-treated
360 mice was severely depleted in neutrophils (only 10% of the BM cells), corresponding to their
361 high number in the peritoneal cavity at 24 h p.i. (Figures 2A and 2D). In contrast, BG65 BM
362 was constituted by 30% of neutrophils which is consistent with their moderated recruitment in

363 the peritoneal cavity after *E. coli* challenge. Although not significant, the difference is the
364 opposite in BM at 8 h p.i. which follows the trend observed in peritoneum. Interestingly, the
365 frequency of neutrophils in BM was decreasing from the beginning of the infection to 8 h p.i.
366 and then increased again at 12 h p.i. to reach the initial levels in the BG65 group. This
367 suggests that granulopoiesis could be influenced by the BG65 oral treatment (Figure 2D).
368 Taken together, the data resulted from oral BG65 or PBS administration followed by i.p.
369 challenge with *E. coli* showed that BG65 treatment protects mice from sepsis by limiting the
370 bacterial expansion as well as lowering the tissue damaging, through the regulation of the
371 inflammatory response.

372 **Primary injection of BG-enriched extract in the mammary gland** 373 **increased NFκB activity upon a secondary *E coli* challenge**

374 The second part of this study was devoted to another experimental model of local infection
375 with *E.coli* P4, after local injection or oral treatment with BG65. Using NFκB reporter mice
376 and a previously described model of murine mastitis [33], we were able to monitor the NFκB
377 activity in the MG, based on a non-invasive real time imaging of the transcription factor
378 activation. We first evaluated NFκB activation associated with BG65 infusion in the lumen of
379 the mammary gland (MG) of lactating mice. After infusion of BG65 (100 μg/gland) in MG
380 (third and fourth pair), we did not observe any significant NFκB signal as compared to the
381 control PBS, at 6-24 h post-IMI (Figure 3A). LPS (100 ng/mL) was used as a positive control
382 and induced a growing and significant increase of NFκB activity, that was maximal at 6 h
383 post-IMI.

384 Although BG65 did not induce significant NFκB activity *per se*, we investigated the priming
385 effects of this BG on mammary tissue towards an infectious challenge.

386 Using the reporter mice, NFκB activity was monitored upon intra-mammary injection of
387 1×10^3 CFU of mCherry-labeled *E.coli* P4 and a primary injection of BG65 (or PBS). As

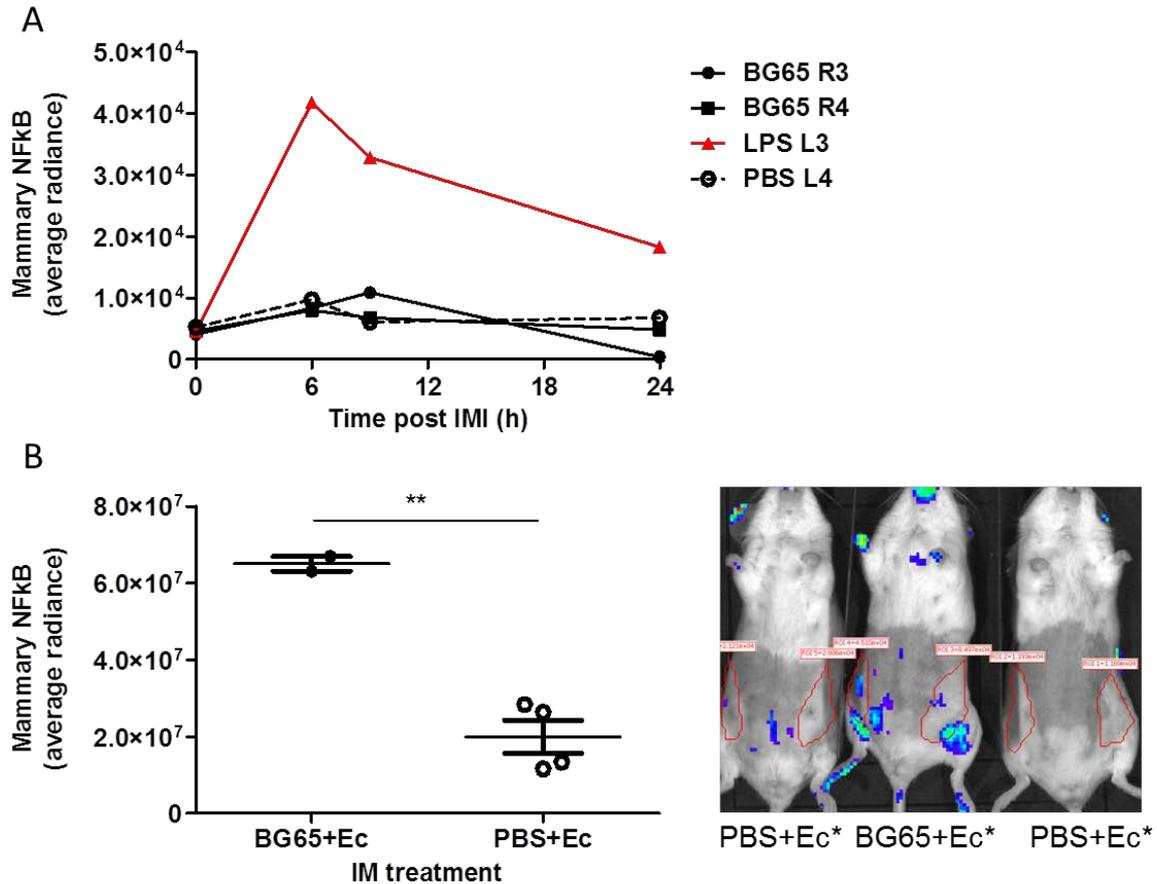


Figure 3

FIGURE 3. IMI of BG65 does not induce mammary NFκB activity per se but primes its activation upon *E. coli* challenge.

(A) NFκB transgenic mice were intramammarily injected with BG65 (100 μg/gland), ultrapure LPS (100 ng/mL) or PBS in third or fourth gland pair. *In vivo* imaging of local NFκB in mammary glands (ventral view) was assessed at 6 h, 9 h and 24 h post-IMI. The data are representative of 3 individual mice. (B) As in (A), NFκB transgenic mice were firstly intramammarily injected with 100 μg of BG65 (N=2) or PBS (N=4). After 8 h of incubation, 1.10³ CFU of *E. coli* P4* strain expressing mCherry was inoculated in MG for another 4 h. Local NFκB activity in MG was then measured *in vivo*. The panel on the left shows data as mean ± SEM. The panel on the right illustrates a representative photograph of mice that received the double IMI: BG65 and *E. coli* (center) or PBS and *E. coli* (right and left). (A-B) Data represent the average radiance (photons/second/cm²/sr) as a quantitative measure of the bioluminescent signal correlating with the NFκB activity (unpaired two-tailed *t*-test, p<0.05 *, p<0.01 **, GraphPad).

388 shown in the figure 3B, the IM injection of BG65 resulted in a significantly higher
389 luminescence signal corresponding to a higher NFκB activation in the MG ($p < 0.01$, $N = 2$ for
390 BG50 and $N = 4$ for PBS) as compared to the PBS -pretreated glands. This suggests that BG65
391 was able to increase the immune responsiveness as indicated by an increase of NFκB towards
392 an IM *E. coli* P4 infection.

393 **Injection of BG in the mammary gland dampens the** 394 **inflammatory response induced by *E. coli***

395 Since leucocyte recruitment to the MG, especially neutrophils, is determinant in the control of
396 bacterial numbers, we sought to analyze the influence of BG65 treatment on the recruitment
397 of neutrophils. After 8 h pretreatment with BG65, we inoculated mCherry-labeled *E. coli* P4
398 and analyzed the response after 20 h. To this end, two different approaches were used in WT
399 C57Bl/6 mice. We first measured the bioluminescent signal by *in vivo* imaging after local
400 injection of luminol. We further excised the mammary gland and isolated the tissue
401 leucocytes before analysis by flow cytometry. Using *in vivo* imaging, we showed that
402 neutrophil influx is significantly increased in *E. coli* P4-inoculated mice as compared to the
403 controls (primary injected with BG65 or PBS) (Figure 4A). Nevertheless, no statistical
404 difference was observed between PBS- or BG65-IMI mice. However, using flow cytometry,
405 we evidenced that BG65 treatment was associated with a consistently lower CD45⁺Ly6G⁺
406 neutrophil recruitment, as compared to PBS-pretreatment ($p < 0.05$, $N = 12$ mice/group) (Figure
407 4B, left). It was worth to note that the neutrophil influx remained low whether BG65 or PBS
408 was injected in the mice, confirming results obtained in Figure 4A. Furthermore, the
409 proportion of CD45⁺F4/80⁺ macrophages recruited was more prominent in the MG of mice
410 treated with PBS upon *E. coli* IMI as compared to the BG65 pretreated MG (Figure 4B, right).
411 Similarly, their recruitment remained low in both groups (BG65 plus *E. coli* or PBS plus
412 PBS). Thus, these results seemed to indicate that BG65 treatment prior to bacterial infection

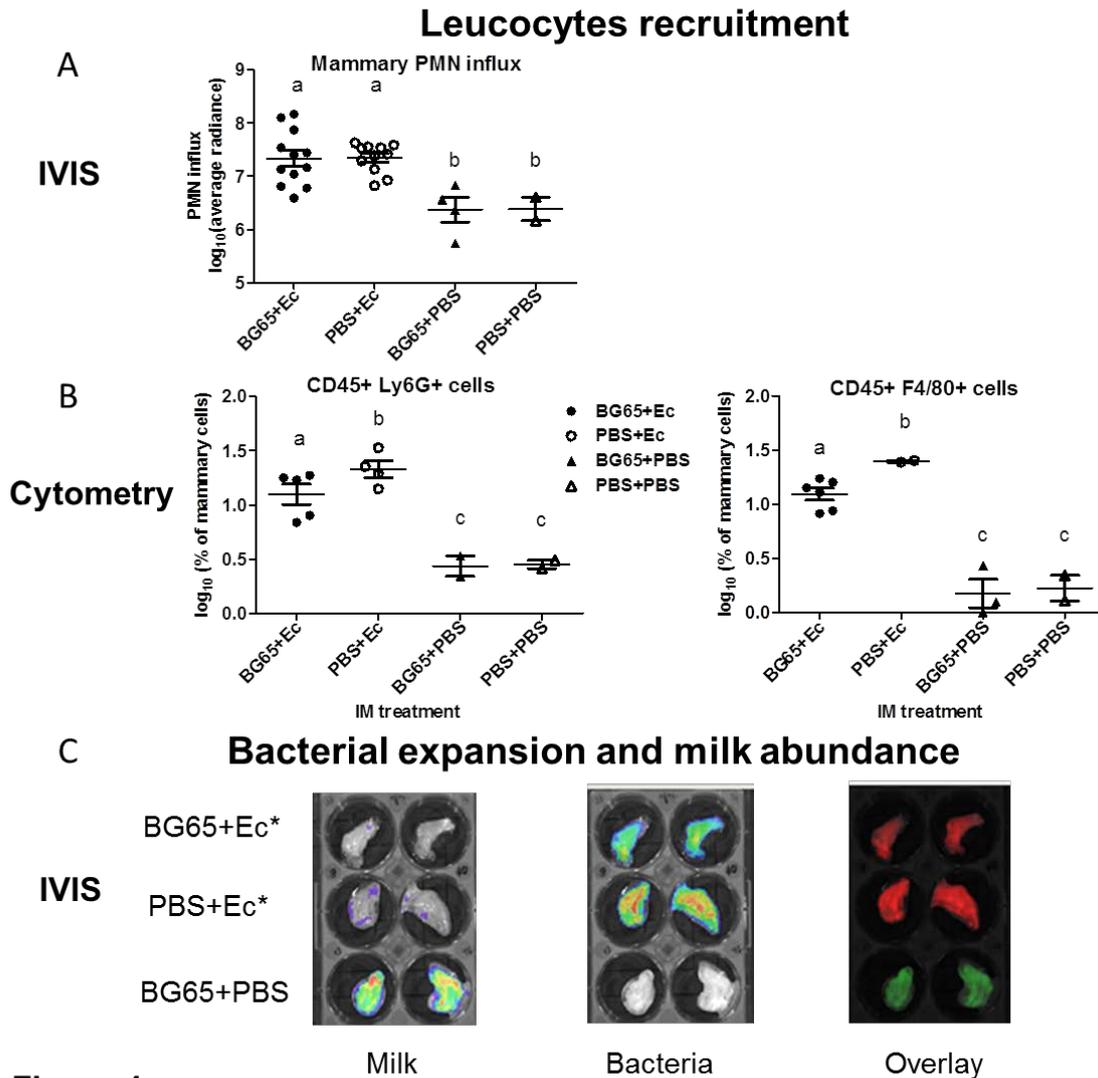


Figure 4

FIGURE 4. Intramammary *Sc* BG-enriched extract injection triggers a lower inflammatory response upon *E. coli* local infection and exhibits lower bacterial charge.

(A-C) C57Bl/6 mice were intramammarily injected with BG65 (100 µg/gland) or PBS in fourth gland pair. After 4 h of incubation, 1.10^3 CFU of *E. coli* P4* strain expressing mCherry or PBS was injected in MG for another 20 h. (A) *Ex vivo* imaging of local neutrophil recruitment in the excised mammary glands was assessed at 20 h post-IMI using luminol. Data represent the average radiance that correlates with the intensity of neutrophils influx in mammary glands (BG65plus *E. coli* or PBS plus *E. coli*, N=12; BG65plus PBS, N=4; PBS plus PBS, N=2).

(B) Leucocytes recruitment was also evaluated at 20 h post-IMI in digested MG. After sacrifice of mice, mammary glands were collected and digested in collagenase type IV. Mammary cells obtained from each group were individually analyzed by flow cytometry using phenotypical markers to identify neutrophils (CD45⁺Ly6G⁺,

left) and macrophages (CD45⁺F4/80⁺, right), as described in the material and methods section. Data are expressed as percentages of single mammary cells (log₁₀ transformed) and each point represents individual gland. Subsets not sharing the same letter are significantly different according to the one-way ANOVA test combined to a Newman-Keuls Multiple post hoc comparison ($p < 0.05$, GraphPad).

(C) Representative photographical view of excised MG post-IMI with BG65 and mCherry *E.coli* (top), PBS and mCherry *E.coli* (middle), or BG65 and PBS (bottom). *Ex vivo* imaging of local milk abundance (left) and bacterial charge (center) were assessed at 20h post-IMI by measuring the fluorescence signal correlating with the abundance of milk (green) or the bacterial charge (red). The right panel shows the overlay of both of the signals.

413 regulates the inflammatory response upon *E. coli* mastitis including recruitment of leucocytes.
414 These data were also consistent with those obtained with the model of *E.coli* SP15 peritonitis.
415 As we used a strain of mCherry expressing *E.coli* P4, the intensity of fluorescence signal was
416 assessed by *ex vivo* bioimaging. Since milk secretion can be evaluated in the green channel,
417 we quantified its relative abundance amongst the gland, in relation to the intensity of the
418 inflammatory response. As presented by the figure 4C, BG65 pretreatment (4 h incubation) is
419 associated with lower bacterial load (left panel) and consequently a slight higher amount of
420 milk (panel in the center) as compared to the gland primarily treated with PBS. As a control,
421 BG65-uninfected glands were devoid of bacteria but presented the highest levels of milk
422 abundance. Superposition of both channels is presented in the third right panel of the figure
423 4C for normalized comparison. Finally, BG65- injection prior to *E. coli* inoculation regulated
424 the intensity of the inflammatory response since cell recruitment was lower, but NF κ B was
425 activated protecting from bacterial expansion. Consistently, intra-mammary infusion with
426 $\beta(1,3)$ -glucans has been related to have positive effects on the clinical and anti-bacterial
427 response to *Staphylococcus aureus* infection at drying off in dairy cows [34].
428 However, whether the BG65 IMI triggers neutrophil recruitment to the MG was not addressed
429 in our study. To clear this point, WT C57BL/6 mice were used to quantify leucocyte
430 recruitment using the same procedures (Figures S3A and 3B). Both methods revealed that
431 BG65 induced a significant increase of neutrophils and inflammatory macrophages in the MG
432 as compared to PBS condition ($p<0.001$ and $p<0.01$ respectively, $N=7$ or 8 mice per group).
433 This suggests that neutrophil influx induced by BG65 contributes to the response against
434 *E.coli* P4. Same observations were also made by other authors who analyzed leucocyte
435 recruitment upon infusion of $\beta(1, 3)$ -glucans but in bovine udder [35]. Indeed, they showed a
436 prominent recruitment of neutrophils and CD14⁺ monocytes/macrophages cells in udder
437 secretions of cows in the BG-treated group.

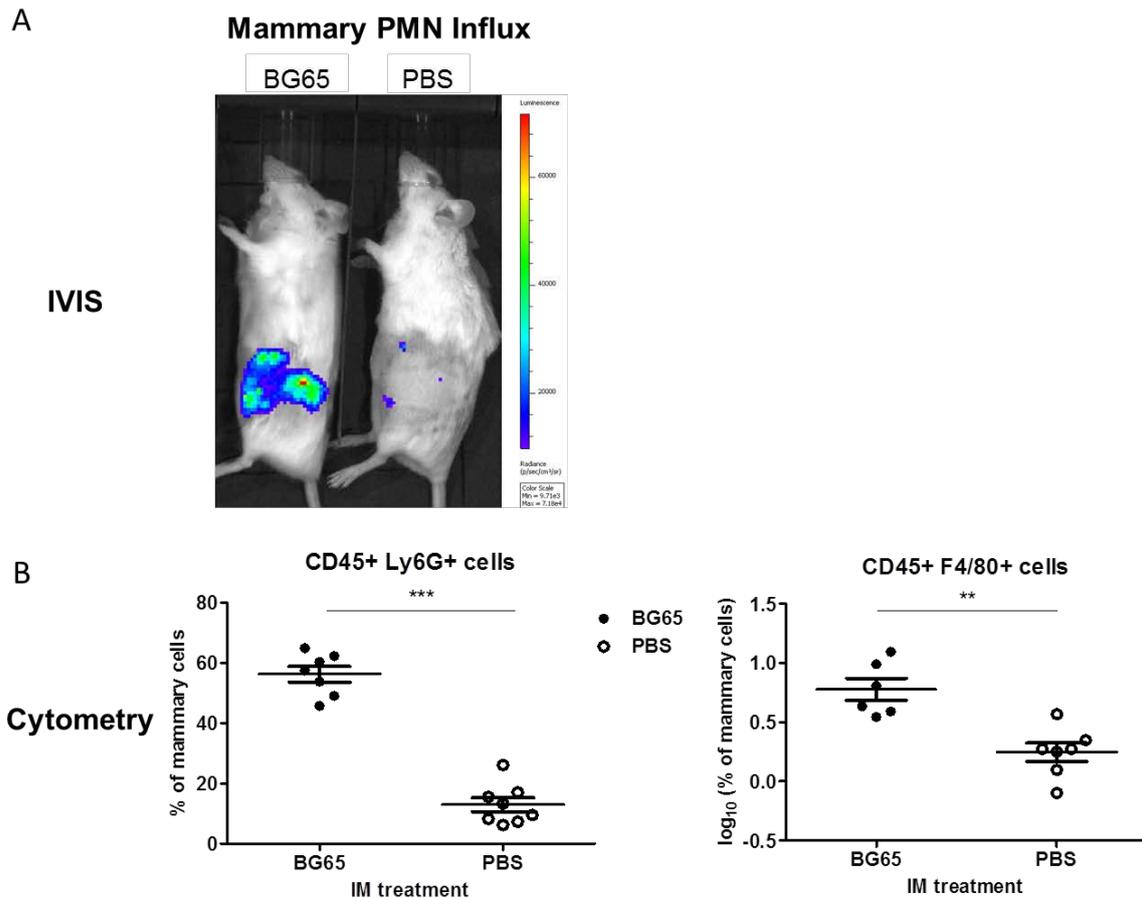


Figure S3

FIGURE S3. IMI of BG65 induces a slight neutrophil recruitment in mammary gland.

(A-B) C57Bl/6 mice were intramammarily injected with BG65 (100 μ g/gland) or PBS in fourth gland pair. **(A)** *In vivo* imaging of local neutrophil recruitment in mammary glands (profile view) was assessed at 24 h post-IMI using luminol. A representative photograph illustrates mice from each group, BG65 (left) and PBS (right) associated with the quantitative bioluminescent signal correlating with the intensity of neutrophils influx. The intensity of luminescence was scaled based on the radiance (in $p*s*m^2$). **(B)** Leucocytes recruitment was also evaluated at 24 h post-IMI in digested MG. After sacrifice of mice, mammary glands were collected and digested in collagenase type IV. Mammary cells obtained from each group were individually analyzed by flow cytometry using phenotypical markers to identify neutrophils (CD45⁺Ly6G⁺) and macrophages (CD45⁺F4/80⁺), as described in the material and methods section. Data are expressed as percentages of single mammary cells (\log_{10} transformed if necessary) and each point represents individual gland (N=8, unpaired two-tailed *t-test*, $p < 0.01$ **, $p < 0.001$ ***, GraphPad).

438 **Oral administration of BG improves the issue of *E. coli* mastitis**

439 To address whether oral supplementation with the same BG preparation could have positive
440 effects on the *E. coli*-induced mastitis, lactating C57BL/6 mice were fed daily with 3
441 mg/mouse of BG65 or PBS for 14 days. They were then intramammarily challenged with
442 1×10^3 CFUs of mCherry *E. coli* P4* /gland. After 20 h of incubation, leucocyte recruitment
443 was analyzed as described above. Measurement of the leucocyte recruitment by bioimaging
444 on excised MG showed that BG65 reduced mammary neutrophil influx as compared to PBS,
445 as illustrated by a representative picture of the bioluminescence signal in excised glands
446 (Figure 5A). Furthermore, these data were confirmed by flow cytometry on extracted
447 mammary leucocytes (Figure 5B). Indeed, CD45⁺Ly6G⁺ neutrophils and CD45⁺F4/80⁺
448 macrophages were present in lower amounts in MG from the mice orally administrated with
449 BG65 than with PBS prior to the mammary infectious challenge. Similarly, when mice
450 received oral BG65 without *E. coli* mammary infection, the proportion of neutrophils (and
451 numbers, data not shown) and macrophages in MG remained weak (Figure 5B).
452 When comparing the fluorescence signal in the red channel (mCherry *E. coli* P4), a significant
453 reduction of the bacterial load was observed in BG65 pretreated mice (Figure 5C, center), as
454 well as a more abundant quantity of milk (Figure 5C, left). These results were also evidenced
455 in the overlay view in the right panel of the figure 5C. Finally, our results showed that as
456 observed in the peritonitis model, BG65 pretreatment before *E. coli* infection improves the
457 condition through dampening of the inflammatory response.
458 Although a few data are still available in this area, recent studies also reported anti-
459 inflammatory effects of BG oral treatment prior to LPS challenge in rats [36] and in heifers
460 [37]. Taken altogether, our data strongly support the promising use of BG as
461 immunomodulators.

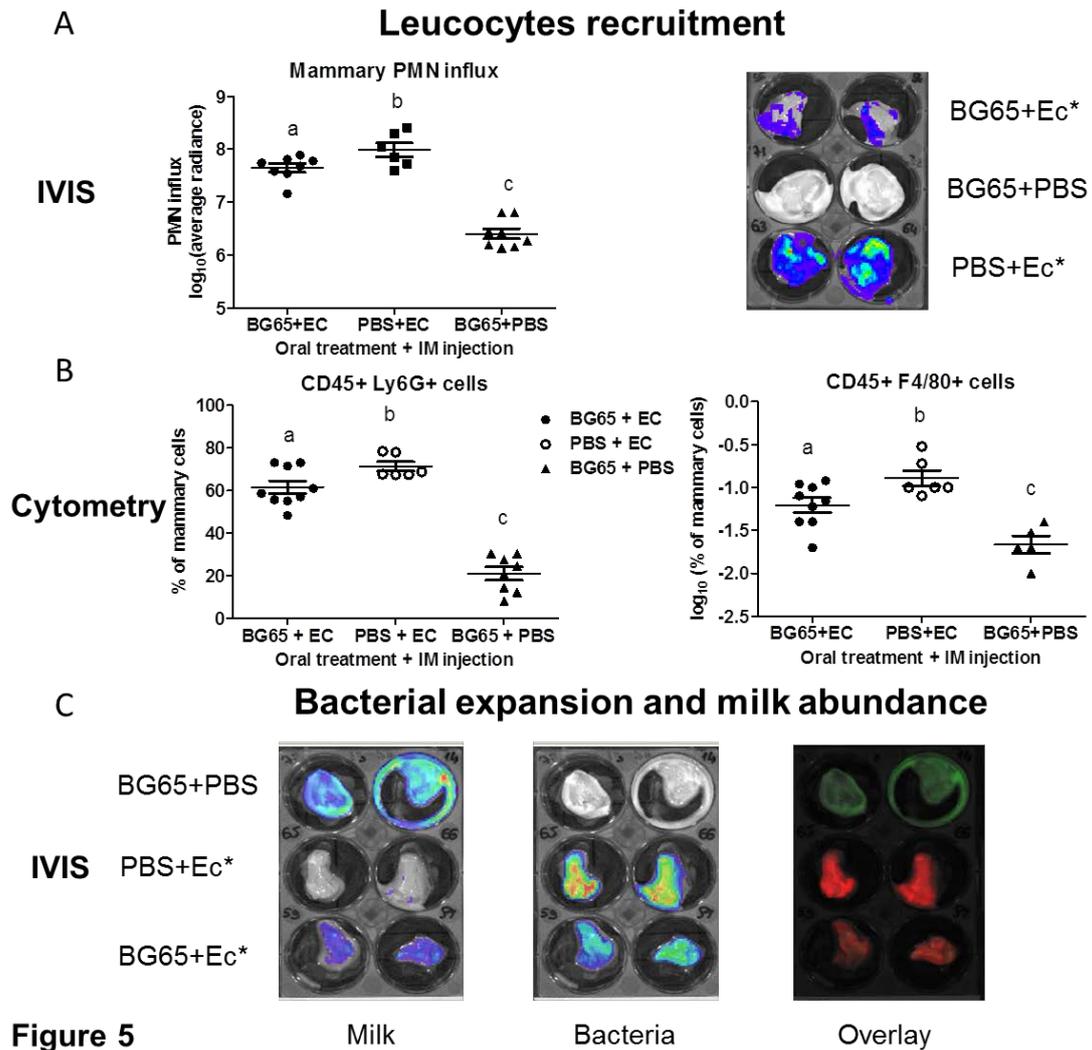


Figure 5

FIGURE 5. Oral administration of *Sc* BG-enriched extract lowers the leucocytes recruitment upon *E. coli* IMI and exhibits reduced bacterial expansion.

(A-C) C57Bl/6 mice were orally administrated with BG65 (3 mg/mice) or PBS daily for 14 days. Intramammary challenge with 1.10^3 CFU of *E. coli* P4* strain expressing mCherry or PBS was performed in fourth gland pair of MG for 20 h. (A) *Ex vivo* imaging of local neutrophil recruitment in the excised mammary glands was assessed at 20 h post-IMI using luminol. Data represent the average radiance (with SEM) that correlates with the intensity of neutrophils influx in mammary glands (BG65plus *E. coli*, N=8; PBS plus *E. coli*, N=6; BG65plus PBS, N=8). A representative photograph of excised gland from each group is shown, BG65 and mCherry *E.coli* (top), BG65 and PBS (middle), or PBS and mCherry *E.coli* (bottom).

(B) Leucocytes recruitment was also evaluated at 20 h post-IMI in digested MG. After sacrifice of mice, mammary glands were collected and digested in collagenase type IV. Mammary cells obtained from each group were individually analyzed by flow cytometry using phenotypical markers to identify neutrophils (CD45⁺Ly6G⁺, left) and macrophages (CD45⁺F4/80⁺, right), as described in the material and methods section. Data are expressed as percentages of single mammary cells (log₁₀ transformed when necessary) and each point represents individual gland. Subsets not sharing the same letter are significantly different according to the one-way ANOVA test combined to a Newman-Keuls Multiple post hoc comparison ($p < 0.05$, GraphPad).

(C) Representative photographical view of excised MG post-IMI with BG65 and PBS (top), PBS and mCherry *E.coli* (middle), or BG65 and mCherry *E.coli* (bottom). *Ex vivo* imaging of local milk abundance (left) and bacterial charge (center) were assessed at 20h post-IMI by measuring the fluorescence signal correlating with the abundance of milk (green) or the bacterial charge (red). The right panel shows the overlay of both of the signals.

462 **References**

- 463 1. Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal β -(1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)-glucans. *Mycol Res.* 2007;111:
464 635–652. doi:10.1016/j.mycres.2007.02.011
- 465 2. Batbayar S, Lee DH, Kim HW. Immunomodulation of Fungal β -Glucan in Host Defense Signaling
466 by Dectin-1. *Biomol Ther.* 2012;20: 433–445. doi:10.4062/biomolther.2012.20.5.433
- 467 3. Brown GD, Gordon S. Fungal β -Glucans and Mammalian Immunity. *Immunity.* 2003;19: 311–315.
468 doi:10.1016/S1074-7613(03)00233-4
- 469 4. Volman JJ, Ramakers JD, Plat J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiol*
470 *Behav.* 2008;94: 276–284. doi:10.1016/j.physbeh.2007.11.045
- 471 5. Brown GD, Gordon S. Immune recognition: A new receptor for β -glucans. *Nature.* 2001;413: 36–
472 37. doi:10.1038/35092620
- 473 6. Yan J, Allendorf DJ, Brandley B. Yeast whole glucan particle (WGP) beta-glucan in conjunction
474 with antitumour monoclonal antibodies to treat cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2005;5: 691–702.
475 doi:10.1517/14712598.5.5.691
- 476 7. Stier H, Ebbeskotte V, Gruenwald J. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-
477 glucan. *Nutr J.* 2014;13: 38. doi:10.1186/1475-2891-13-38
- 478 8. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2004;4: 11–24. doi:10.1038/nri1255
- 479 9. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NAR. An integrated model of the recognition of *Candida*
480 *albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6: 67–78.
481 doi:10.1038/nrmicro1815
- 482 10. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, et al. Dectin-1 Is A
483 Major β -Glucan Receptor On Macrophages. *J Exp Med.* 2002;196: 407–412.
484 doi:10.1084/jem.20020470
- 485 11. Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, et al. The β -Glucan
486 Receptor, Dectin-1, Is Predominantly Expressed on the Surface of Cells of the
487 Monocyte/Macrophage and Neutrophil Lineages. *J Immunol.* 2002;169: 3876–3882.
488 doi:10.4049/jimmunol.169.7.3876
- 489 12. Drummond RA, Brown GD. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections.
490 *Curr Opin Microbiol.* 2011;14: 392–399. doi:10.1016/j.mib.2011.07.001
- 491 13. Underhill DM, Rossnagle E, Lowell CA, Simmons RM. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a
492 dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood.* 2005;106: 2543–2550.
493 doi:10.1182/blood-2005-03-1239
- 494 14. Herre J, Marshall ASJ, Caron E, Edwards AD, Williams DL, Schweighoffer E, et al. Dectin-1 uses
495 novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood.* 2004;104: 4038–4045.
496 doi:10.1182/blood-2004-03-1140

- 497 15. Suram S, Brown GD, Ghosh M, Gordon S, Loper R, Taylor PR, et al. Regulation of Cytosolic
498 Phospholipase A2 Activation and Cyclooxygenase 2 Expression in Macrophages by the β -Glucan
499 Receptor. *J Biol Chem.* 2006;281: 5506–5514. doi:10.1074/jbc.M509824200
- 500 16. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 Mediates the
501 Biological Effects of β -Glucans. *J Exp Med.* 2003;197: 1119–1124. doi:10.1084/jem.20021890
- 502 17. Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, et al. Syk-Dependent
503 Cytokine Induction by Dectin-1 Reveals a Novel Pattern Recognition Pathway for C Type Lectins.
504 *Immunity.* 2005;22: 507–517. doi:10.1016/j.immuni.2005.03.004
- 505 18. LeibundGut-Landmann S, Groß O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, et al. Syk- and
506 CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce
507 interleukin 17. *Nat Immunol.* 2007;8: 630–638. doi:10.1038/ni1460
- 508 19. Cain JA, Newman SL, Ross GD. Role of complement receptor type three and serum opsonins in
509 the neutrophil response to yeast. *Complement Basel Switz.* 1987;4: 75–86.
- 510 20. Walachowski S, Tabouret G, Foucras G. Triggering Dectin-1-Pathway Alone Is Not Sufficient to
511 Induce Cytokine Production by Murine Macrophages. *PloS One.* 2016;11: e0148464.
512 doi:10.1371/journal.pone.0148464
- 513 21. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of
514 inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med.* 2003;197: 1107–1117.
515 doi:10.1084/jem.20021787
- 516 22. Dennehy KM, Ferwerda G, Faro-Trindade I, Pyz E, Willment JA, Taylor PR, et al. Syk kinase is
517 required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors.
518 *Eur J Immunol.* 2008;38: 500–506. doi:10.1002/eji.200737741
- 519 23. Williams DDL, Mueller A, Browder W. Glucan-Based Macrophage Stimulators. *Clin Immunother.*
520 2012;5: 392–399. doi:10.1007/BF03259335
- 521 24. de Felipe Júnior J, da Rocha e Silva Júnior M, Maciel FM, Soares A de M, Mendes NF. Infection
522 prevention in patients with severe multiple trauma with the immunomodulator beta 1-3
523 polyglucose (glucan). *Surg Gynecol Obstet.* 1993;177: 383–388.
- 524 25. Rice PJ, Adams EL, Ozment-Skelton T, Gonzalez AJ, Goldman MP, Lockhart BE, et al. Oral Delivery
525 and Gastrointestinal Absorption of Soluble Glucans Stimulate Increased Resistance to Infectious
526 Challenge. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314: 1079–1086. doi:10.1124/jpet.105.085415
- 527 26. Suzuki I, Tanaka H, Kinoshita A, Oikawa S, Osawa M, Yadomae T. Effect of orally administered
528 beta-glucan on macrophage function in mice. *Int J Immunopharmacol.* 1990;12: 675–684.
- 529 27. Wójcik R. Effect of Biolex Beta-HP on phagocytic activity and oxidative metabolism of peripheral
530 blood granulocytes and monocytes in rats intoxicated by cyclophosphamide. *Pol J Vet Sci.*
531 2010;13: 181–188.
- 532 28. Hong F, Yan J, Baran JT, Allendorf DJ, Hansen RD, Ostroff GR, et al. Mechanism by which orally
533 administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal
534 antibodies in murine tumor models. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004;173: 797–806.

- 535 29. Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis
536 economics in dairy cattle herds. *Vet Res.* 2003;34: 475–491. doi:10.1051/vetres:2003027
- 537 30. Bramley AJ. Variations in the susceptibility of lactating and non-lactating bovine udders to
538 infection when infused with *Escherichia coli*. *J Dairy Res.* 1976;43: 205–211.
- 539 31. Buscher K, Wang H, Zhang X, Striewski P, Wirth B, Saggi G, et al. Protection from septic
540 peritonitis by rapid neutrophil recruitment through omental high endothelial venules. *Nat*
541 *Commun.* 2016;7: 10828. doi:10.1038/ncomms10828
- 542 32. Sandvik A, Wang YY, Morton HC, Aasen AO, Wang JE, Johansen F-E. Oral and systemic
543 administration of beta-glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ
544 injury in rats. *Clin Exp Immunol.* 2007;148: 168–177. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03320.x
- 545 33. Notebaert S, Carlsen H, Janssen D, Vandenabeele P, Blomhoff R, Meyer E. In vivo imaging of NF-
546 kappaB activity during *Escherichia coli*-induced mammary gland infection. *Cell Microbiol.*
547 2008;10: 1249–1258. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01123.x
- 548 34. Persson Waller K, Grönlund U, Johannisson A. Intramammary infusion of beta1,3-glucan for
549 prevention and treatment of *Staphylococcus aureus* mastitis. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public*
550 *Health.* 2003;50: 121–127.
- 551 35. Inchaisri C, Waller KP, Johannisson A. Studies on the modulation of leucocyte subpopulations
552 and immunoglobulins following intramammary infusion of beta 1,3-glucan into the bovine udder
553 during the dry period. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2000;47: 373–386.
- 554 36. Zhu W, Gu B, Miao J, Lu J, Zou S. Dectin1 activation of β -(1-3)/(1-6)-D-glucan produces an anti-
555 mastitis effect in rats. *Inflamm Res Off J Eur Histamine Res Soc Al.* 2011;60: 937–945.
556 doi:10.1007/s00011-011-0354-1
- 557 37. Sanchez NCB, Young TR, Carroll JA, Corley JR, Rathmann RJ, Johnson BJ. Yeast cell wall
558 supplementation alters the metabolic responses of crossbred heifers to an endotoxin challenge.
559 *Innate Immun.* 2014;20: 104–112. doi:10.1177/1753425913482152
- 560

Chapitre III : Discussion générale et perspectives

Dans les filières de production animale et en particulier chez les ruminants et le porc, les levures vivantes ou les produits issus des levures comme leurs parois, sont utilisés depuis une dizaine d'années comme additifs alimentaires pour leurs effets positifs sur les performances et la santé des animaux [429–432]. Plus récemment, leur utilisation est promue dans l'espoir qu'ils puissent permettre une réduction de l'usage des antibiotiques pour le traitement et la prévention de certaines maladies infectieuses [433]. Ces additifs alimentaires sont facilement accessibles ; les sous-produits des levures peuvent provenir des industries de la brasserie ou de la panification, et plus rarement de la fermentation directement réalisée en élevages, ou de la production commerciale par les industriels spécialisés en alimentation animale. Cependant, leurs modes d'action chez l'animal en lien avec l'augmentation des performances des animaux, restent mal compris. Les levures vivantes ont été décrites comme ayant des effets protecteurs sur la muqueuse intestinale contre l'invasion de micro-organismes, en agissant comme antagonistes sur les agents indésirables (effet barrière), ou en contribuant à la stimulation ou à la maturation des cellules immunitaires de l'hôte [434]. Les composants de la paroi des levures, dont les polyosides et les mannanes, peuvent également participer à la prévention de la colonisation du tractus digestif de l'hôte par des agents pathogènes en se liant spécifiquement aux bactéries, mais aussi grâce à leur rôle prébiotique en favorisant le développement d'espèces bactériennes bénéfiques au microbiote intestinal [435–437]. Les β -glucanes, composants majeurs de la paroi de levure, peuvent stimuler la réponse immunitaire de l'hôte, notamment en activant les cellules phagocytaires comme les macrophages. En effet, les oligosides présents dans la paroi des levures ou les levures vivantes distribuées par voie orale ont des effets bénéfiques sur l'immunité, sur le contrôle de la dissémination des agents pathogènes et la défense antibactérienne, chez les espèces de rente comme le porc [438–442], la vache laitière [443], les volailles [444] ou encore chez les poissons [445,446].

Il existe un intérêt croissant des industries de l'alimentation animale mais aussi de la nutraceutique, pour développer des substances naturelles qui améliorent la défense de l'hôte contre les maladies infectieuses afin de préserver la santé humaine et animale. Cependant, il existe une certaine confusion sur les allégations relatives à la santé, attribuées aux levures et à leurs produits dérivés, en raison des procédés industriels d'extraction qui ont un effet majeur sur la qualité et la pureté des sous-produits finaux. Ces deux derniers paramètres sont directement reliés à la composition de la préparation et à la structure de ses composants qui influencent leurs propriétés biologiques et par conséquent l'effet sur la réponse immunitaire de l'hôte.

La recherche de composés efficaces utilisables sur les animaux de production à laquelle nous avons contribué, repose largement sur le recours aux essais de criblage de l'activité *in vitro* ou aux études *in vivo* réalisées chez la souris et le rat. En effet, pour corroborer et justifier les effets observés *in vitro*, ces méthodes demeurent indispensables notamment pour comprendre les mécanismes d'action potentiels ou encore pour tester une large gamme de produits à des concentrations et/ou des durées d'incubation variables. Bien qu'indispensables, les études réalisées *in vitro* restent très controversées précisément parce qu'elles ne sont pas réalisées dans les mêmes conditions et ne tiennent pas compte des facteurs environnementaux (température, pression, milieu, biodisponibilité). Par ailleurs, dans le cas des BG, il est important et nécessaire de standardiser les conditions expérimentales et de préciser l'origine, la structure et la pureté des préparations utilisées pour obtenir des résultats reproductibles, comprendre le rôle effectif des BG dans l'immuno-modulation et leur mécanisme d'action sur les cellules immunitaires. Finalement, la combinaison d'essais menés *in vitro* et *in vivo* contribue à l'identification et à la validation des propriétés des produits testés et à une meilleure compréhension des modes d'action des composés d'intérêt.

Dans cette étude, nous avons associé les approches *in vitro* et *in vivo* afin de déterminer les propriétés immunostimulantes des β -glucanes et de mesurer leur impact dans le cadre d'infections systémiques ou locales à *E. coli*. Le point fort de notre étude repose sur l'utilisation d'une série de préparations contenant des BG en proportions variables, mais issus de la même souche de *Sc*. A l'aide de différents traitements chimiques et enzymatiques, un degré d'enrichissement progressif de 15, 65 et 75% de BG était disponible. En comparaison, les différents travaux publiés dans le domaine ont recours à des composés dont la pureté en BG est rarement précisée, au mieux donnée de façon approximative. De plus, les effets de certaines préparations sont souvent attribués à tort aux BG alors qu'ils résultent de l'activité des autres composants, notamment les mannanes, les chitines ou les protéines de la paroi de levure.

Nous avons pu évaluer le rôle et l'activité biologique des BG (i) à l'aide de diverses approches *in vitro*, en utilisant différentes sources de macrophages, et (ii) dans différents modèles *in vivo* chez la souris, notamment en multipliant les voies d'administration. Au cours des essais réalisés *in vitro*, la partie mécanistique a été étudiée grâce à l'utilisation de lignées cellulaires rapporteurs de l'activité NF κ B/AP-1, surexprimant certains récepteurs (TLR4,

TLR4, Dectin-1), ou au contraire n'exprimant pas une molécule essentielle de la voie de signalisation des TLRs.

Nous avons également utilisé des cellules primaires provenant de souris invalidées pour Dectin-1. Par la suite, nous avons transposé les conditions ainsi établies à l'échelle de l'organisme tout entier, de manière à évaluer de façon intégrée et globale les effets des BG et à appréhender leur influence systémique sur les cellules immunitaires, mais aussi non-immunitaires. Les BG peuvent en effet être reconnus par les différents récepteurs, Dectin-1, CR3, LacCer et SR qui sont exprimés non seulement à la surface des cellules immunitaires (monocytes/macrophages, cellules dendritiques, neutrophiles) mais aussi de certaines cellules épithéliales localisées dans les sites qui constituent des interfaces favorables avec les agents pathogènes : la peau, les poumons, la cavité buccale et le tractus digestif, et les organes lymphoïdes [321].

La voie d'administration peut aussi influencer le mode d'action des BG sur les cellules. Bien que les effets favorables des BG administrés par voie systémique (intra-veineuse ou intra-péritonéale) aient été décrits dès le début des années 90 [423,424], leur efficacité biologique après administration orale demeure confuse. Nous avons ainsi apprécié d'une part l'action systémique et locale des BG après injection intrapéritonéale et intra-mammaire, et d'autre part évalué leurs modalités d'action après transit à travers le système digestif de la souris. A ce jour, il est admis que les BG sont pris en charge par les cellules M (Microfold) pinocytaires de l'intestin grêle - des cellules épithéliales spécialisées dans le transport des macromolécules -, avant d'être transférés dans les plaques de Peyer où les particules de BG sont reconnues puis internalisées par les macrophages et les cellules dendritiques [426,439]. Vraisemblablement, les particules libérées rejoindraient les nœuds lymphatiques, la rate et la moelle osseuse où elles pourraient modifier le phénotype et activer les cellules immunitaires [241]. Ces données prouvent que les BG administrés par voie orale atteignent la circulation générale mais bien entendu, en quantités inférieures par rapport à une administration systémique [447]. Conformément à ce que nous avons précédemment évoqué, la taille des particules de BG conditionne leur reconnaissance par les cellules M qui ne transportent que les BG dont la taille dépasse 2MDa [425].

Si la question de l'absorption des BG par la muqueuse intestinale semble trouver quelques réponses ces dernières années chez les monogastriques, elle reste en suspens chez les polygastriques, *i.e.* les espèces bovine, ovine et caprine. Un essai préliminaire réalisé chez

trois vaches ne nous a pas permis de mettre en évidence la présence de BG particulières dans le plasma après 10 jours d'apport quotidien de BG65 (500 g/j/vache). Toutefois, la méthode de détection utilisée n'était probablement pas la plus adaptée.

En effet, la lignée HEK-Dectin-1 rapporteur de l'activité de ce récepteur permet la détection de BG particulières. Or cette forme physique est probablement peu abondante dans le sang ; si les BG sont absorbés et diffusent à l'échelle systémique, il s'agit plutôt de la forme soluble.

Diverses approches ont été mises en œuvre pour établir le profil d'activité des BG à la fois en système monocellulaire grâce à la culture de macrophages mais aussi à l'échelle du tissu et de l'hôte grâce à des systèmes plus complexes prenant en compte l'interaction entre plusieurs types cellulaires et envisager ainsi la réponse globale de l'hôte. En effet, beaucoup d'études n'ont appréhendé la réponse que d'un seul type cellulaire pris isolément par souci de simplification. Notre étude présente l'avantage d'avoir multiplié les approches techniques et donc les preuves de l'activité des BG à différents niveaux à la fois, qu'ils soient cellulaires, tissulaires, ou à l'échelle de l'organisme tout entier. L'utilisation d'une technique d'imagerie non invasive nous a permis d'évaluer l'activité NFκB et le recrutement neutrophilique intramammaires.

La caractérisation de la réponse induite par les BG sur les macrophages s'est focalisée sur deux composantes, la tolérance et l'efficacité des BG. Que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, nous avons évalué la tolérance des cellules ou des tissus en mesurant les effets directement induits par les différentes préparations contenant des BG sur les cellules. En revanche, l'efficacité a été appréhendée en mesurant les effets indirectement induits par les BG, notamment en évaluant les effets d'une première exposition des tissus ou des cellules aux BG suivie d'une seconde stimulation par des bactéries ou des ligands bactériens isolés. Ces deux actions sont conditionnées par l'expression d'un ou plusieurs récepteur(s) permettant l'interaction des récepteurs avec leurs ligands.

La première partie de notre travail consistait à caractériser précisément la réponse induite par les BG sur les macrophages. Nous avons montré que les BG particulières enrichis ne sont pas capables d'induire une production significative de cytokines et de chimiokines ni l'activation des facteurs de transcription NFκB/AP-1 *per se* dans les macrophages de différentes sources, quelles que soient la durée d'incubation et la dose administrée.

Une expérience de chimiotaxie réalisée *in vitro* a également mis en évidence que les BMDM traités par les BG enrichis sécrètent de faibles quantités de chimiokines, dont celles spécialisées dans le recrutement de neutrophiles (CXCL1 et CXCL2), provoquant en conséquence un faible afflux de neutrophiles. Au contraire, les extraits bruts de paroi (BG15 ou zymosan) sont de forts activateurs de la réponse inflammatoire incluant la synthèse de cytokines pro- (IL-6, TNF α , IL-1 β) et anti-inflammatoires (IL-10), et de chimiokines (CCL2), et de façon dépendante des TLRs. Ce constat a été confirmé à différents niveaux, (i) la forte activité TLR2 et TLR4 associée à BG15 et Zymosan, (ii) une activité NF κ B/AP-1 significative et (iii) la forte baisse de la production de TNF α dans les macrophages MyD88^{-/-}. Ainsi la forte activation des cellules résultant d'un traitement avec les parois brutes n'est pas induite par leur contenu en BG comme le décrivent la plupart des études ayant été réalisées dans ce domaine [285,329], mais par la présence des autres composants de la paroi de levure, notamment les mannanes reconnus par TLR4 ou MR selon leur structure [173]. De plus, la collaboration de Dectin-1 et d'autres TLRs (TLR2 et TLR4 en particulier) pour la synthèse cytokinique a été décrite dans la littérature par le passé [84,379]. Ceci explique la diminution de la production des cytokines pro-inflammatoires dans les macrophages des souris invalidées pour Dectin-1. La faible production de cytokines par les macrophages exposés à BG65 ou BG75 (extraits de paroi enrichis en BG à 65% et 75% respectivement), qui est néanmoins abolie dans les cellules Dectin-1^{-/-}, peut être expliquée par l'implication d'autres récepteurs de BG, par exemple LacCer, CR3 ou SR, ou par la collaboration Dectin-1/TLR, qui reste cependant limitée en raison de la purification plus grande des composés que nous avons utilisés. A la différence, dans les macrophages MyD88^{-/-} comme WT, la production de TNF α reste inchangée montrant que les BG ne sont pas initiateurs de la voie TLR ; ceci ayant été confirmé par ailleurs par la faible activité NF κ B/AP-1 rapportée par la lignée de macrophages murins RAW-Blue suite à leur incubation avec les composés enrichis en BG.

Ces données sont également cohérentes avec les résultats issus de l'étude des phénotypes d'activation du macrophage après incubation avec les composés enrichis ou avec les composés bruts (Figure II-4). Alors que BG15 induit une réponse inflammatoire précoce qui se rapproche de celle qui caractérise le phénotype M1 (induction des gènes *Il1b*, *Il12p40*, *Ccl2*, *Ccl3*, *Nos2*...), sous l'effet de l'IL-10 produite en faible quantité, ce dernier s'oriente vers un phénotype pro-résolutif de « désactivation » de type M2c (*Stat3*, *Socs3*, *Ccl1*, *Arg1*).

Au contraire, les BMDM incubés avec les composés enrichis, BG65 et BG75 se caractérisent par un phénotype totalement distinct de celui induit par BG15 et nettement moins pro-inflammatoire. L'induction précoce et significative de *Ccl22*, *Ccl24*, *Socs2*, *Klf4*, *Pparg* montre que BG65 et BG75 de façon plus modérée, initient un phénotype d'activation alternative de type M2a [33,408].

Certains auteurs ont affirmé que les BMDM des souris C57Bl/6 ne sont pas en mesure de produire des cytokines en raison d'une anomalie de la voie Syk-CARD9 sous Dectin-1, ou de l'expression de Dectin-1 qui peut être sous-optimale à cause de la méthode de différenciation utilisée. Nous avons (i) évalué l'expression de Dectin-1 sur les BMDM et sur les macrophages résidents de la cavité péritonéale (RPM) ou recrutés à la suite de l'injection de thioglycollate (TEPM) et (ii) mesuré la production de TNF α par les TEPM provenant de souris sauvages ou déficientes pour Dectin-1 en réponse aux composés enrichis (BG65 et BG75) ou bruts (BG15 et Zymosan).

D'une part, les BMDM ont été différenciés en milieu L929 qui selon Gersuk et al favorise une expression optimale de Dectin-1 à la surface des macrophages en comparaison des cellules différenciées avec le M-CSF recombinant [448]. D'autre part, la comparaison de l'expression de Dectin-1 à la surface des macrophages de différentes origines par cytométrie de flux a révélé que les BMDM, les TEPM et RPM, et les RAW-Blue expriment des niveaux similaires de Dectin-1. De plus, les TEPM au même titre que les BMDM, produisent de plus faibles quantités de TNF α en réponse aux BG enrichis qu'en réponse aux extraits bruts de paroi de *Sc* (Zymosan ou BG15), production qui est d'ailleurs fortement altérée chez les souris invalidées pour Dectin-1. Ainsi en écho à la publication de Goodridge et al [327], nous avons démontré que les BG enrichis ne sont pas capables d'induire une production significative de cytokines quelle que soit la provenance tissulaire des macrophages. Nous avons également observé que l'administration des BG enrichis par voie intrapéritonéale chez la souris ne conduit pas à la production de TNF α ni d'IL-6 dans la cavité péritonéale (données non présentées).

Comme nous l'avons précédemment vu dans la partie bibliographique, les méthodes d'extraction des BG peuvent influencer la structure des molécules et leur solubilité, et donc modifier ou altérer leur activité biologique. Pour cette raison, nous avons au préalable évalué les différents composés BG15, BG65 et BG75 de même que les composés commerciaux à l'aide de lignées cellulaires surexprimant le récepteur Dectin-1, pour mesurer et comparer l'activité des BG sur ce récepteur.

Les extraits enrichis BG65 et BG75 ont une forte activité Dectin-1 à la dose utilisée dans nos études, de même que BG15 et dans une moindre mesure le Zymosan, qui contiennent également des BG. Cela signifie donc que les méthodes utilisées pour purifier les extraits de paroi BG65 et BG75 n'altèrent pas ou peu les propriétés biologiques des BG.

Le WGP est un composé particulière issu de la paroi de *Sc* dont la composition en BG avoisine 75% et qui est commercialisé pour améliorer l'immunité, prévenir et lutter contre les infections. Il est utilisé par voie orale chez l'homme dans des essais cliniques visant à augmenter le taux de survie chez les patients atteints de cancer [192]. De façon surprenante, le WGP montre une activité Dectin-1 très limitée par rapport à BG65 et BG75. Cela confirme donc la nécessité de maîtriser la composition et l'activité biologique des composés.

En parallèle, des essais similaires menés avec ces mêmes préparations sur des lignées surexprimant TLR2 ou TLR4 ont révélé que le processus d'enrichissement élimine progressivement les ligands de ces récepteurs, qui sont responsables de la réponse des macrophages. L'utilisation de la lignée HEK surexprimant TLR9, récepteur qui peut coopérer avec Dectin-1 [449,450], a confirmé l'absence de résidus d'acides nucléiques levuriens dans les extraits de paroi.

Les conséquences de la taille des particules de BG ont également été mises en question pour leur reconnaissance par le récepteur Dectin-1. En effet, lorsque les particules sont trop grandes, elles ne peuvent ne pas être prises en charge par ce récepteur qui ne peut donc pas engager la voie correspondante conduisant à la production de cytokines. Afin de résoudre ce point, différentes méthodes de dispersion mécanique des composés ont été utilisées avant l'application sur les macrophages. Ces traitements n'ont pas pour autant modifié la réponse cellulaire. Si cela ne semble pas le cas pour Dectin-1, l'internalisation des particules par CR3 est conditionnée par la taille des particules [241,291]. Par ailleurs, plusieurs études ont montré que lorsque la cellule n'est pas capable de phagocyter la particule à cause d'une taille trop grande (Curdlan par exemple) - un processus désigné « frustrated phagocytosis » -, elle augmente de façon significative la production de cytokines via Dectin-1 [328]. Bien que ce concept reste ambigu et contestable, il confirme la faible capacité des BG enrichis à produire des quantités détectables de cytokines.

Si au premier abord les BG ne semblent pas induire des modifications majeures du phénotype des macrophages de façon directe, le second volet de ce travail a permis de mettre en exergue leur capacité immunomodulatrice lors de la seconde exposition des macrophages à un stimulus bactérien.

En effet, seuls les BMDM préalablement traités avec les BG enrichis sont capables de développer une réponse cytokinique synergisée (TNF α et IL-1 β) suite à un second stimulus bactérien ciblant sélectivement TLR4 (LPS), TLR2 (Pam3CSK4) ou un ensemble de récepteurs impliqués dans la reconnaissance des bactéries vivantes, *Escherichia coli* P4 ou *Staphylococcus aureus* N305. La synergie induite par le prétraitement des cellules avec des BG enrichis ne se résume pas donc à un seul TLR isolé mais peut être généralisé à l'ensemble des TLRs. Des résultats similaires concernant le 'priming' des cellules par les BG particuliers ont été décrits dans l'article de Ifrim et al, dans lequel les auteurs ont utilisé des BG provenant de *C. albicans* et des bactéries tuées comme stimulus secondaire [451].

Nous avons montré que cette réponse synergisée est significativement diminuée dans les BMDM invalidés pour Dectin-1, et ce pour les deux cytokines dosées, TNF α et IL-1 β . La synergie résiduelle résulte probablement des interactions entre les autres récepteurs de BG, ou les récepteurs des autres composants des préparations avec les signaux TLR, comme décrits en détail dans la revue bibliographique. De façon similaire et plus attendue, le signal est totalement aboli dans les BMDM n'exprimant pas MyD88, la molécule clé de la voie de certains TLRs exprimés à la surface cellulaire. Finalement, nous avons mis en évidence que la synergie induite par les BG enrichis après un second stimulus est un phénomène dose-dépendant et tardif qui fait certainement suite à la synthèse d'une protéine *de novo*, et qui ne fait pas appel à une augmentation de l'activité NF κ B/AP-1.

A la différence des BG enrichis, les extraits de paroi brute (BG15 et Zymosan) utilisés comme premier stimulus n'induisent qu'une faible production de cytokines, qui au mieux, atteint le niveau de celles produites par les cellules non prétraitées. Dans ces conditions, l'invalidation de Dectin-1 n'induit qu'une diminution faible voire nulle de la production de TNF α et d'IL1 β . En revanche, la déficience de MyD88 dans les cellules prétraitées par BG15 et Zymosan abolit totalement la synthèse de ces cytokines, suggérant que l'effet passant par Dectin-1 est restreint lorsque la teneur en BG des préparations est faible. De façon plus marquée, les cellules préalablement incubées avec le LPS et recevant un second stimulus de la même nature sont incapables de mettre en place une réponse cytokinique significative.

Le phénomène de tolérance mis en évidence pour les endotoxines du type LPS peut s'appliquer ici avec les extraits bruts [73,452,453]. Sous l'effet d'un premier stimulus (LPS), les cellules deviennent réfractaires à toute stimulation supplémentaire. En effet, Zymosan et BG15 induisent une réponse qui ressemble à celle produite par la stimulation avec du LPS, comme l'indique la synthèse des cytokines mesurées dans les surnageants de culture ou l'expression génique que nous avons réalisée, mais ne semblent pas être en mesure de mettre en place une réponse antibactérienne efficace. Cette hypothèse semble être en accord avec les résultats précédemment obtenus.

En effet, l'analyse du profil d'expression des gènes nous a permis d'identifier un phénotype de type M2c pour les macrophages préalablement incubés avec BG15, phénotype également associé à la désactivation cellulaire [33]. Récemment, une étude a montré que la tolérance au LPS est en réalité associée à une voie de polarisation alternative M2 impliquée dans l'immunorégulation et la réparation tissulaire [454]. Ces résultats corroborent notre hypothèse selon laquelle les extraits bruts, qui provoquent une forte activation cellulaire *per se*, induisent un état de désactivation de la cellule qui s'apparente à la tolérance.

Pour comprendre la réponse synergisée associée aux BG enrichis dans des conditions infectieuses, une analyse transcriptomique nous a permis d'identifier les gènes les plus fortement activés par l'exposition préalable aux BG enrichis. Deux gènes fortement induits par BG65 et BG75 de façon spécifique, *Csf2* et *Fhl2* ont été identifiés. Le cas de *Csf2* (codant GM-CSF) sera abordé plus tard dans cette discussion. De façon suprenante et inattendue, l'induction de *Fhl2* est associée spécifiquement à l'engagement de Dectin-1 par les BG enrichis. Ce résultat a été confirmé au niveau protéique. Par ailleurs, nous avons également montré que ce gène est induit précocément par les BG enrichis. La protéine FHL2 est un médiateur doté de propriétés fonctionnelles très diverses, qui est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation dont la voie NFκB [455]. Son niveau d'expression semble être très dépendant du type cellulaire étudié et les mécanismes moléculaires associés ne sont pas décrits, particulièrement dans les cellules qui ne l'expriment pas ou peu comme les macrophages. Dans ce travail, nous avons révélé pour la première fois l'implication de FHL2 dans la voie de signalisation sous-jacente à Dectin-1.

Malgré une apparente inactivité, BG65 et BG75 stimulent l'activité bactéricide, de façon plus marquée que BG15 et le Zymosan. En effet, les BMDM produisent des niveaux significativement plus élevés de ROS, et ce, indépendamment de Dectin-1- mais sous le

contrôle de CR3. En revanche, les extraits bruts BG15 et Zymosan induisent une faible synthèse de ROS par les BMDM qui est à la fois Dectin-1-dépendante et CR3-dépendante. Ces résultats semblent cohérents avec certaines études réalisées avec le Zymosan [285,456] mais contrastent avec d'autres [84,263,329,341] qui affirment que le Zymosan induit une forte explosion respiratoire. Alors que Dectin-1 était considéré comme un récepteur majeur de la phagocytose des BG, il s'avère que c'est CR3 qui remplit majoritairement cette fonction et sans recourir obligatoirement à l'opsonisation. L'hétérogénéité des résultats montre à nouveau que les mécanismes d'action des BG restent majoritairement complexes et mal compris.

Nous avons également observé que dans les macrophages traités avec les BG enrichis, la production de GM-CSF reste insignifiante aux temps précoces. En revanche, l'expression de *Csf2* (gène codant GM-CSF) est fortement et spécifiquement activée par les BG enrichis aux temps tardifs de l'expérimentation ; cette induction étant totalement absente dans les cellules provenant des souris invalidées pour Dectin-1. Bien qu'un lien ait déjà été fait entre Dectin-1 et GM-CSF, notre étude est l'une des premières à montrer que l'induction de GM-CSF est une conséquence tardive de l'engagement spécifique de la voie Dectin-1 par les BG [417,420,421]. La relation directe entre les BG et la production de GM-CSF par les macrophages n'a été que très peu mise en évidence. En effet, une seule étude a montré la production de GM-CSF en réponse au Curdlan, au Zymosan ou aux BG solubles extraits du maitake par les macrophages péritoneaux [417]. L'initiation précoce de la production de GM-CSF résulte de l'engagement de Dectin-1 indépendamment d'ERK/MAPK, alors que la plus tardive requiert Syk en aval de Dectin-1. En collaboration avec Dectin-1, GM-CSF est capable d'augmenter significativement la réponse induite de façon spécifique par les BG [322,417,418,421]. Par ailleurs, GM-CSF est considéré comme un potentiateur de l'activité biologique des monocytes/macrophages notamment grâce à ses effets sur la chimiotaxie, l'explosion respiratoire, la survie des cellules et l'élimination des micro-organismes lors d'une infection [419,420]. GM-CSF peut également lever la tolérance au LPS dans les macrophages et restaurer la production de TNF α par les monocytes humains préalablement soumis au même stimulus [457]. En lien avec ces observations, il semblerait donc que la production de GM-CSF induite tardivement et sous le contrôle de Dectin-1 par BG65, soit capable de préparer la cellule à un stimulus secondaire. Cette hypothèse explique que les BMDM préincubés avec BG65 et BG75 amplifient fortement la production de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β et TNF α) induites par une seconde exposition avec des bactéries vivantes ou des ligands mimant une infection bactérienne.

Par ailleurs, dans ces conditions, la production de GM-CSF est également synergisée par les BG enrichis et sous le contrôle de Dectin-1, comme nous l'avons montré dans l'article 2. Ceci suggère que l'activation tardive de GM-CSF intensifie et maintient l'activation des macrophages en réponse à l'action combinée des BG et d'un stimulus bactérien. GM-CSF semble donc être l'élément central de l'immunomodulation induite par les BG enrichis en agissant selon une boucle autocrine. Cette hypothèse est d'ailleurs cohérente avec les résultats obtenus par Min et al sur les cellules dendritiques co-stimulées avec GM-CSF et le Curdlan [421]. Il convient de noter que les cellules dendritiques sont différenciées en présence de GM-CSF, ce qui peut avoir des conséquences sur leur phénotype initial et expliquer pourquoi l'engagement de Dectin-1 par les BG sur ces cellules donne lieu à une réponse de plus forte intensité [327].

L'ensemble de nos résultats montrent que les BG enrichis n'induisent pas directement la production cytokinique mais préparent la cellule à un second stimulus bactérien, contre lequel elle va diriger une réponse synergisée. Ce phénomène porte le nom de Trained Immunity.

La notion de « trained immunity » ou « mémoire de l'immunité innée » a été décrite pour la première fois en 2014 et a fait l'objet de deux publications dans la revue *Science* [458–460]. Elle se caractérise par une réponse cytokinique intense en réponse à une restimulation des cellules préalablement exposées à un BG ou une levure vivante. Cette notion s'oppose à la tolérance, induite par le LPS précédemment décrite dans cette discussion. L'immunité entraînée est considérée comme un moyen d'augmenter l'efficacité de l'immunité innée en cas d'infection et notamment celles des macrophages et des monocytes, qui sont les principales cellules à pouvoir être ainsi éduquées. Elle se traduit par une reprogrammation de l'épigénome de la cellule et notamment par des changements stables dans la triméthylation des histones (H3K4) qui résulte de l'induction de la voie non canonique Raf-1 dans les monocytes. Ces modifications épigénétiques sont à l'origine de l'ouverture de la chromatine et donc de l'augmentation de la transcription des gènes. L'immunité entraînée aboutit à l'activation cellulaire et à l'augmentation de la production de cytokines. De même, elle conduit à la modification du métabolisme de la cellule qui va passer de la phosphorylation oxydative (ayant comme source d'énergie l'ATP) à la glycolyse aérobie (ayant comme source d'énergie le glucose) sous l'action de deux acteurs majeurs induits par Dectin-1, mTOR (mammalian target of rapamycin) et HIF-1 α (hypoxia-inducible-factor 1 α).

Ainsi, les souris ayant été entraînées avec les BG sont résistantes à un sepsis provoqué par *Staphylococcus aureus* alors que les souris non entraînées ne sont pas protégées et meurent.

Alors que nos conditions expérimentales *in vitro* incluent un prétraitement de 8 h seulement avec les BG, directement suivi d'une stimulation avec un ligand de TLR, l'immunité entraînée a été mise en évidence en utilisant des monocytes qui sont soumis à un premier traitement suivi d'un second stimulus six jours plus tard, entrecoupé d'une période de repos sans stimulation. Cela suggère donc que l'immunité entraînée est un phénomène stable et durable, dont la reprogrammation fonctionnelle autorise une interruption du traitement sans affecter la mise en place du processus. Cette propriété est particulièrement intéressante notamment en vue d'une application future dans la prévention des maladies infectieuses.

Ainsi l'immunité entraînée s'oppose à la tolérance avec des ligands différents qui les induisent. Cette étude montre donc qu'il est d'une importance capitale de caractériser les produits issus des levures et de connaître leur composition précise avant d'envisager leur utilisation. En effet, l'administration d'extraits de parois brutes de type BG15 ou Zymosan dans le cadre d'une prophylaxie aurait pour conséquence le développement d'une immunotolérance qui pourrait être délétère en cas d'infection. A la différence, l'administration de BG enrichis permettrait à l'hôte de mettre en place une réponse appropriée et efficace contre différents agents pathogènes sans spécificité des mécanismes préalables.

Ces hypothèses expliquent d'ailleurs les résultats obtenus chez la souris. En effet, les souris ayant reçu les BG par voie orale ont éliminé plus efficacement les bactéries et avaient des dommages tissulaires moins marqués dans le foie, la rate ou la glande mammaire (mesuré par la quantité relative de lait produite) que les souris du groupe contrôle, et ce quel que soit le mode d'infection utilisé, qu'il soit systémique par voie intra-péritonéale ou local par voie intramammaire. Ces souris dont l'immunité a été entraînée par les BG ont également développé des réponses inflammatoires plus modérées localement (recrutement neutrophilique plus faible) que les souris non prétraitées.

L'ensemble des résultats obtenus dans ce travail et les hypothèses formulées précédemment montrent que les BG possèdent des propriétés immuno-stimulantes qui contribuent significativement à l'élimination des agents pathogènes et à la protection de l'hôte en limitant les dommages tissulaires provoqués par une inflammation excessive. Par conséquent, ils

représentent un intérêt majeur pour le développement de stratégies alternatives dans la lutte contre les maladies infectieuses et peuvent concourir à l'objectif actuel de réduire l'usage des antibiotiques.

ANNEXES

ANNEXES

Annexe 1 : Poster CIFMA, 2014



Etude des propriétés immuno-modulatrices de composés pariétaux de levure sur l'activité macrophagique

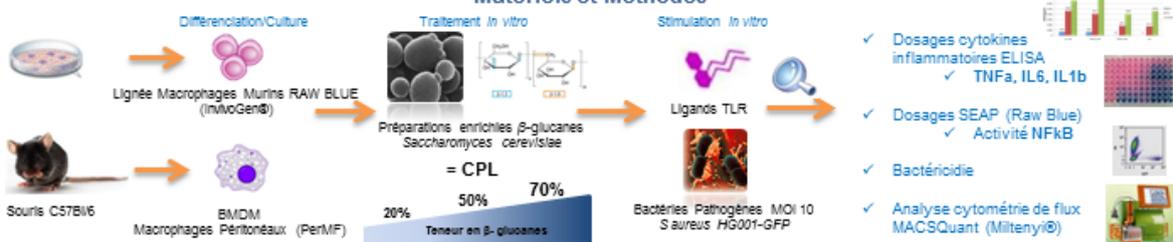
Sarah Walachowski, Guillaume Tabouret, Gilles Foucras

Université de Toulouse, INP-ENVT et INRA, UMR 1225 IHAP Equipe Immunologie

Introduction – Objectifs

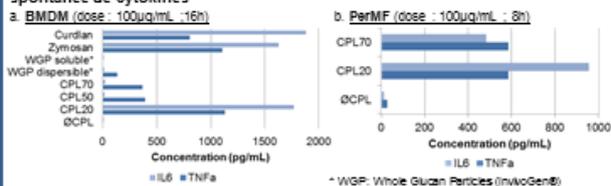
Des études menées chez l'homme et en modèle murin ont décrit les bêta-glucanes, composés pariétaux de levures (CPL), comme des particules capables d'induire une activation des cellules du système immunitaire inné *in vitro* et *in vivo* via leur principal récepteur, Dectin-1 [1,2,3,4]. L'objectif de cette étude est de déterminer les effets des bêta-glucanes sur les macrophages murins *in vitro* et les mécanismes modulant la réactivité des macrophages en présence d'une bactérie.

Matériels et Méthodes

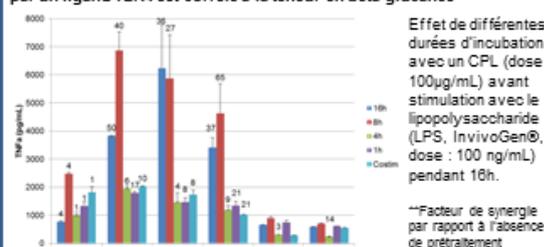


Résultats

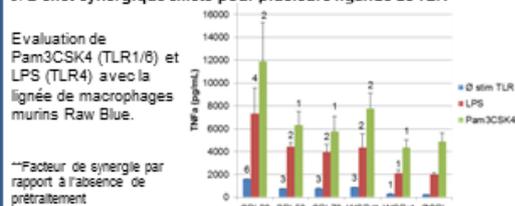
1. Les CPL enrichis en bêta-glucanes induisent une faible production spontanée de cytokines



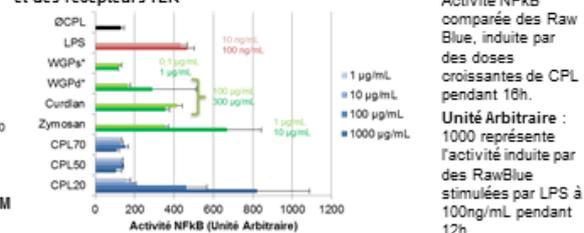
2. L'effet synergique sur la production de cytokines après stimulation des BMDM par un ligand TLR4 est corrélé à la teneur en bêta-glucanes



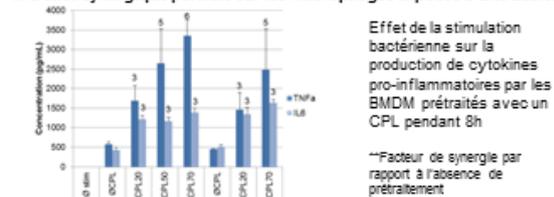
3. L'effet synergique existe pour plusieurs ligands de TLR



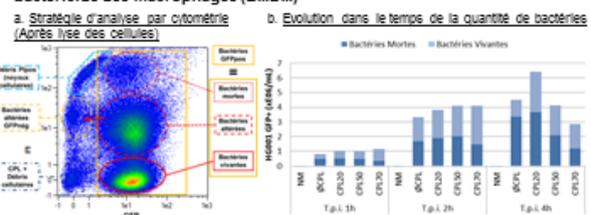
4. L'activité des CPL enrichis en β-glucanes est indépendante de NFκB et des récepteurs TLR



5. L'effet synergique persiste sur les macrophages exposés à une bactérie



6. Les CPL enrichis en β-glucanes augmentent l'activité phagocytaire et bactéricide des macrophages (BMDM)



Discussions - Perspectives

Ces résultats montrent que les β-glucanes modifient la réponse basale des macrophages murins et améliorent leurs compétences bactéricides. Ces données suggèrent que les CPL pourraient constituer des immuno-modulateurs d'intérêt. Des travaux en cours évaluent la transposition aux espèces de rente.

Références Bibliographiques :

- [1] Brown et al., 2002. Dectin-1 is a major beta-glucan receptor on macrophages. *J. Exp. Med.* 296:407-412.
- [2] Goodridge et al., 2011. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a phagocytic capsule. *Nature* 472: 471-475.
- [3] Katooka et al., 2002. Activation of macrophages by linear (1,3)-beta-D-glucans. *J. Biol. Chem.* 277:36325-36331.
- [4] Gil et al., 2011. Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived beta-glucans. *117:6825-6836.*
- [5] Taylor et al., 2007. Dectin-1 is required for beta-glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.* 8:31-35.

Annexe 2 : Listes des communications

Publications

S. WALACHOWSKI, G. TABOURET, G. FOUCRAS (2016). Triggering Dectin-1-Pathway Alone Is Not Sufficient to Induce Cytokine Production by Murine Macrophages. PLoS ONE, 11(2):e0148464. doi:10.1371/journal.pone.0148464

Communications orales et affichées

S. WALACHOWSKI, G. TABOURET, G. FOUCRAS (2014). Etude des propriétés immuno-modulatrices de composés pariétaux de levure sur l'activité macrophagique. CIFMA Toulouse, 15-16 mai 2014. Communication affichée.

S. WALACHOWSKI, G. TABOURET, G. FOUCRAS (2014). Yeast cell wall components modulate immune activity of murine and bovine macrophages. Biofit 2014, SIMV, Institut Carnot Santé Animale, R&D dating for animal health and innovation, 2-3 décembre 2014. Communication orale.

S. WALACHOWSKI, G. TABOURET, G. FOUCRAS (2015). *Saccharomyces cerevisiae* cell wall compounds modulate immune activity of murine and bovine macrophages. Journée des doctorants de l'UPS, 5 mars 2015. Communication orale.

Publication hors thèse

S. WALACHOWSKI, V. DORENLOR, J. LEFEVRE, A. LUNAZZI, F. EONO, T. MERBAH, E. EVENO, N. PAVIO, N. ROSE (2014). Risk factors associated with the presence of hepatitis E virus in livers and seroprevalence in slaughter-age pigs: a retrospective study of 90 swine farms in France. *Epidemiology and Infection*, 142, pp 1934-1944. doi:10.1017/S0950268813003063.

Annexe 3 : Listes des formations

Récapitulatif de participation aux Formations

Récapitulatif de participation aux Formations Sarah WALACHOWSKI
--

Doctorat : Pathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition

Ecole Doctorale : SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries

Etablissement : UT3 - Université de Toulouse 3 Paul Sabatier

Date de la 1ere inscription en these : 15 octobre 2012 (4 A en 2015)

Directeur de these : Gilles FOUCRAS

Sujet de these : Etude des propriétés immunostimulantes de composés de levure chez les bovins et application aux infections bactériennes de la glande mammaire

Formations suivies

Catégorie : Divers

* French-German Summerschool for the Promotion of Veterinary Science : Membrane Proteins : From Cloning to Function Faculté de Médecine Vétérinaire Justus Liebig - Université de Giessen

80 heures enregistrées par : SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries.

Total du nombre d'heure pour la catégorie Divers : 80 h

Catégorie : Formations scientifiques

* Utilisation et Protection de l'Animal de Laboratoire Niveau 1 Formation Continue ENVT Toulouse

74 heures enregistrées par : SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries.

Total du nombre d'heure pour la catégorie Formations scientifiques : 74 h

Catégorie : Méthodes, outils, langages

* Présentation Orale des Résultats de Recherche en Anglais Centre INRA Auzeville-Toulouse

21 heures enregistrées par : SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries.

Total du nombre d'heure pour la catégorie Méthodes, outils, langages : 21 h

Catégorie : Séminaires

* Séminaire Résidentiel Annuel de l'EIR-Agreenium Ecole Internationale de Recherche Agreenium-Bordeaux Sciences Agro

30 heures enregistrées par : SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries.

* Séminaire résidentiel annuel EIRA Agreenium-AgroParisTech Nancy INRA de Nancy- Lorraine, AgroParisTech Nancy et l'Université de Lorraine

20 heures enregistrées par : SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries.

Total du nombre d'heures pour la catégorie Séminaires : 50 h

Total participation : 225 heures / 5 modules

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BIBLIOGRAPHIE

EFSA NDA Panel (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies), 2010. Scientific Opinion on the substantiation of a health claim related to oat beta glucan and lowering blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease pursuant to Article 14 of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2010;8(12):1885, 15 pp. doi:10.2903/j.efsa.2010.188.

EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA); Scientific Opinion on the safety of “Yeast beta-glucans” as a Novel Food ingredient. *EFSA Journal* 2011;9(5):2137, 22 pp. doi:10.2903/j.efsa.2011.2137.

1. Riggi SJ, Di Luzio NR. Identification of a reticuloendothelial stimulating agent in zymosan. *Am J Physiol.* 1961;200: 297–300.
2. Qi C, Cai Y, Gunn L, Ding C, Li B, Kloecker G, et al. Differential pathways regulating innate and adaptive antitumor immune responses by particulate and soluble yeast-derived β -glucans. *Blood.* 2011;117: 6825–6836. doi:10.1182/blood-2011-02-339812
3. Tian J, Ma J, Ma K, Guo H, Baidoo SE, Zhang Y, et al. β -Glucan enhances antitumor immune responses by regulating differentiation and function of monocytic myeloid-derived suppressor cells. *Eur J Immunol.* 2013;43: 1220–1230. doi:10.1002/eji.201242841
4. Whitehead A, Beck EJ, Tosh S, Wolever TM. Cholesterol-lowering effects of oat β -glucan: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr.* 2014;100: 1413–1421. doi:10.3945/ajcn.114.086108
5. Chen J, Raymond K. Beta-glucans in the treatment of diabetes and associated cardiovascular risks. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4: 1265–1272.
6. Chen J, Seviour R. Medicinal importance of fungal β -(1→3), (1→6)-glucans. *Mycol Res.* 2007;111: 635–652. doi:10.1016/j.mycres.2007.02.011
7. Munemoto Y, Iida Y, Abe J, Saito H, Fujisawa K, Kasahara Y, et al. Significance of postoperative adjuvant immunochemotherapy after curative resection of colorectal cancers: Association between host or tumor factors and survival. *Int J Oncol.* 2002; doi:10.3892/ijo.20.2.403
8. Abbas AK, Lichtman AH. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique.* Elsevier Masson; 2008.
9. Shaykhiev R, Bals R. Interactions between epithelial cells and leukocytes in immunity and tissue homeostasis. *J Leukoc Biol.* 2007;82: 1–15. doi:10.1189/jlb.0207096
10. Baroni A, Buommino E, De Gregorio V, Ruocco E, Ruocco V, Wolf R. Structure and function of the epidermis related to barrier properties. *Clin Dermatol.* 2012;30: 257–262. doi:10.1016/j.clindermatol.2011.08.007
11. Linden SK, Sutton P, Karlsson NG, Korolik V, McGuckin MA. Mucins in the mucosal barrier to infection. *Mucosal Immunol.* 2008;1: 183–197. doi:10.1038/mi.2008.5

12. Medzhitov R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*. 2007;449: 819–826. doi:10.1038/nature06246
13. Gordon S. Elie Metchnikoff: Father of natural immunity. *Eur J Immunol*. 2008;38: 3257–3264. doi:10.1002/eji.200838855
14. Metchnikoff E. *Leçons sur la pathologie comparée de l'inflammation: faites à l'Institut Pasteur en 1891*. Paris: Masson; 1892.
15. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ*. 1972;46: 845–852.
16. Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol*. 2005;5: 953–964. doi:10.1038/nri1733
17. Pollard JW. Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9: 259–270. doi:10.1038/nri2528
18. Cedric Auffray, Michael H. Sieweke, Geissmann F. Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27: 669–692. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132557
19. Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood Monocytes Consist of Two Principal Subsets with Distinct Migratory Properties. *Immunity*. 2003;19: 71–82. doi:10.1016/S1074-7613(03)00174-2
20. Yona S, Kim K-W, Wolf Y, Mildner A, Varol D, Breker M, et al. Fate mapping reveals origins and dynamics of monocytes and tissue macrophages under homeostasis. *Immunity*. 2013;38: 79–91. doi:10.1016/j.immuni.2012.12.001
21. Naito M, Umeda S, Yamamoto T, Moriyama H, Umezu H, Hasegawa G, et al. Development, differentiation, and phenotypic heterogeneity of murine tissue macrophages. *J Leukoc Biol*. 1996;59: 133–138.
22. Czernielewski JM, Demarchez M. Further evidence for the self-reproducing capacity of Langerhans cells in human skin. *J Invest Dermatol*. 1987;88: 17–20.
23. Parwaresch MR, Wacker HH. Origin and kinetics of resident tissue macrophages. Parabiosis studies with radiolabelled leucocytes. *Cell Tissue Kinet*. 1984;17: 25–39.
24. Sawyer RT, Strausbauch PH, Volkman A. Resident macrophage proliferation in mice depleted of blood monocytes by strontium-89. *Lab Invest J Tech Methods Pathol*. 1982;46: 165–170.
25. Melnicoff MJ, Horan PK, Breslin EW, Morahan PS. Maintenance of peritoneal macrophages in the steady state. *J Leukoc Biol*. 1988;44: 367–375.
26. Lichanska AM, Hume DA. Origins and functions of phagocytes in the embryo. *Exp Hematol*. 2000;28: 601–611. doi:10.1016/S0301-472X(00)00157-0

27. Ovchinnikov DA. Macrophages in the embryo and beyond: Much more than just giant phagocytes. *genesis*. 2008;46: 447–462. doi:10.1002/dvg.20417
28. Kanitakis J, Petruzzo P, Dubernard J-M. Turnover of Epidermal Langerhans' Cells. *N Engl J Med*. 2004;351: 2661–2662. doi:10.1056/NEJM200412163512523
29. Chorro L, Sarde A, Li M, Woollard KJ, Chambon P, Malissen B, et al. Langerhans cell (LC) proliferation mediates neonatal development, homeostasis, and inflammation-associated expansion of the epidermal LC network. *J Exp Med*. 2009;206: 3089–3100. doi:10.1084/jem.20091586
30. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, Tetzlaff W, Rossi FMV. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci*. 2007;10: 1538–1543. doi:10.1038/nn2014
31. Davies LC, Taylor PR. Tissue-resident macrophages: then and now. *Immunology*. 2015;144: 541–548. doi:10.1111/imm.12451
32. Jenkins SJ, Ruckerl D, Cook PC, Jones LH, Finkelman FD, van Rooijen N, et al. Local macrophage proliferation, rather than recruitment from the blood, is a signature of TH2 inflammation. *Science*. 2011;332: 1284–1288. doi:10.1126/science.1204351
33. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol*. 2004;25: 677–686. doi:10.1016/j.it.2004.09.015
34. F B, Y B, E B, B H, M L, N S, et al. The biology of macrophages. *Pathol Biol (Paris)*. 1997;45: 103–109.
35. Auger MJ, Ross JA, Lewis CE, O'D. McGee J. *The Macrophage: The Natural Immune System*. Oxford University Press; 1992.
36. Davies LC, Jenkins SJ, Allen JE, Taylor PR. Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol*. 2013;14: 986–995. doi:10.1038/ni.2705
37. Markiewski MM, Lambris JD. The Role of Complement in Inflammatory Diseases From Behind the Scenes into the Spotlight. *Am J Pathol*. 2007;171: 715–727. doi:10.2353/ajpath.2007.070166
38. Sarma JV, Ward PA. The Complement System. *Cell Tissue Res*. 2011;343: 227–235. doi:10.1007/s00441-010-1034-0
39. K A Joiner, E J Brown, Frank and MM. Complement and Bacteria: Chemistry and Biology in Host Defense. *Annu Rev Immunol*. 1984;2: 461–492. doi:10.1146/annurev.iy.02.040184.002333
40. Carroll MC. The Role of Complement and Complement Receptors in Induction and Regulation of Immunity. *Annu Rev Immunol*. 1998;16: 545–568. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.545

41. Ricklin D, Lambris JD. Complement in immune and inflammatory disorders: pathophysiological mechanisms. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013;190: 3831–3838. doi:10.4049/jimmunol.1203487
42. Mogensen TH. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22: 240–273. doi:10.1128/CMR.00046-08
43. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leukoc Biol*. 2007;81: 1–5. doi:10.1189/jlb.0306164
44. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 2010;140: 805–820. doi:10.1016/j.cell.2010.01.022
45. Beutler BA. TLRs and innate immunity. *Blood*. 2009;113: 1399–1407. doi:10.1182/blood-2008-07-019307
46. Hoffmann JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature*. 2003;426: 33–38. doi:10.1038/nature02021
47. Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*. 2004;16: 3–9. doi:10.1016/j.smim.2003.10.003
48. Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, Sanjo H, Ogawa T, Takeda Y, et al. Cutting Edge: Toll-Like Receptor 4 (TLR4)-Deficient Mice Are Hyporesponsive to Lipopolysaccharide: Evidence for TLR4 as the Lps Gene Product. *J Immunol*. 1999;162: 3749–3752.
49. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen Recognition and Innate Immunity. *Cell*. 2006;124: 783–801. doi:10.1016/j.cell.2006.02.015
50. Kawai T, Akira S. Toll-like Receptors and Their Crosstalk with Other Innate Receptors in Infection and Immunity. *Immunity*. 2011;34: 637–650. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.006
51. Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009;21: 317–337. doi:10.1093/intimm/dxp017
52. Blasius AL, Beutler B. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity*. 2010;32: 305–315. doi:10.1016/j.immuni.2010.03.012
53. Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009;388: 621–625. doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.062
54. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, et al. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97: 13766–13771.
55. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest*. 2012;122: 2711–2719. doi:10.1172/JCI62423

56. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock Augusta Ga.* 2006;26: 174–179. doi:10.1097/01.shk.0000225404.51320.82
57. Ivanov S, Dragoi A-M, Wang X, Dallacosta C, Louten J, Musco G, et al. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA. *Blood.* 2007;110: 1970–1981. doi:10.1182/blood-2006-09-044776
58. Yanai H, Ban T, Wang Z, Choi MK, Kawamura T, Negishi H, et al. HMGB proteins function as universal sentinels for nucleic-acid-mediated innate immune responses. *Nature.* 2009;462: 99–103. doi:10.1038/nature08512
59. Krishnan J, Selvarajoo K, Tsuchiya M, Lee G, Choi S. Toll-like receptor signal transduction. *Exp Mol Med.* 2007;39: 421–438. doi:10.1038/emm.2007.47
60. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2007;7: 179–190. doi:10.1038/nri2038
61. Underhill DM. Collaboration between the innate immune receptors dectin-1, TLRs, and Nods. *Immunol Rev.* 2007;219: 75–87. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00548.x
62. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Hoshino K, Kaisho T, Sanjo H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 2003;301: 640–643. doi:10.1126/science.1087262
63. Kawai T, Takeuchi O, Fujita T, Inoue J, Mühlradt PF, Sato S, et al. Lipopolysaccharide Stimulates the MyD88-Independent Pathway and Results in Activation of IFN-Regulatory Factor 3 and the Expression of a Subset of Lipopolysaccharide-Inducible Genes. *J Immunol.* 2001;167: 5887–5894. doi:10.4049/jimmunol.167.10.5887
64. Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol.* 2009;9: 535–542. doi:10.1038/nri2587
65. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, Uematsu S, Hoshino K, Kaisho T, et al. TRAM is specifically involved in the Toll-like receptor 4-mediated MyD88-independent signaling pathway. *Nat Immunol.* 2003;4: 1144–1150. doi:10.1038/ni986
66. Sato S, Sugiyama M, Yamamoto M, Watanabe Y, Kawai T, Takeda K, et al. Toll/IL-1 Receptor Domain-Containing Adaptor Inducing IFN- β (TRIF) Associates with TNF Receptor-Associated Factor 6 and TANK-Binding Kinase 1, and Activates Two Distinct Transcription Factors, NF- κ B and IFN-Regulatory Factor-3, in the Toll-Like Receptor Signaling. *J Immunol.* 2003;171: 4304–4310. doi:10.4049/jimmunol.171.8.4304
67. Doyle SE, Vaidya SA, O’Connell R, Dadgostar H, Dempsey PW, Wu T-T, et al. IRF3 Mediates a TLR3/TLR4-Specific Antiviral Gene Program. *Immunity.* 2002;17: 251–263. doi:10.1016/S1074-7613(02)00390-4
68. Napolitani G, Rinaldi A, Bertonni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected TLR agonist combinations synergistically trigger a TH1 polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol.* 2005;6: 769–776. doi:10.1038/ni1223

69. Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G, Fassbender M, Heib V, Schmid B, et al. Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood*. 2006;108: 544–550. doi:10.1182/blood-2005-10-4015
70. Bagchi A, Herrup EA, Warren HS, Trigilio J, Shin H-S, Valentine C, et al. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007;178: 1164–1171.
71. Sato S, Nomura F, Kawai T, Takeuchi O, Mühlradt PF, Takeda K, et al. Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2000;165: 7096–7101.
72. Beutler E, Gelbart T, West C. Synergy between TLR2 and TLR4: a safety mechanism. *Blood Cells Mol Dis*. 2001;27: 728–730. doi:10.1006/bcmd.2001.0441
73. Dobrovolskaia MA, Medvedev AE, Thomas KE, Cuesta N, Toshchakov V, Ren T, et al. Induction of in vitro reprogramming by Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 agonists in murine macrophages: effects of TLR “homotolerance” versus “heterotolerance” on NF-kappa B signaling pathway components. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003;170: 508–519.
74. Re F, Strominger JL. IL-10 released by concomitant TLR2 stimulation blocks the induction of a subset of Th1 cytokines that are specifically induced by TLR4 or TLR3 in human dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004;173: 7548–7555.
75. Zelensky AN, Gready JE. The C-type lectin-like domain superfamily. *FEBS J*. 2005;272: 6179–6217. doi:10.1111/j.1742-4658.2005.05031.x
76. Brown GD. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern-recognition receptor. *Nat Rev Immunol*. 2006;6: 33–43. doi:10.1038/nri1745
77. Hardison SE, Brown GD. C-type Lectin Receptors Orchestrate Anti-Fungal Immunity. *Nat Immunol*. 2012;13: 817–822. doi:10.1038/ni.2369
78. Willment JA, Brown GD. C-type lectin receptors in antifungal immunity. *Trends Microbiol*. 2008;16: 27–32. doi:10.1016/j.tim.2007.10.012
79. McGreal EP, Martinez-Pomares L, Gordon S. Divergent roles for C-type lectins expressed by cells of the innate immune system. *Mol Immunol*. 2004;41: 1109–1121. doi:10.1016/j.molimm.2004.06.013
80. Kerrigan AM, Brown GD. Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs. *Immunol Rev*. 2010;234: 335–352. doi:10.1111/j.0105-2896.2009.00882.x
81. Gordon S. Pathogen recognition or homeostasis? APC receptor functions in innate immunity. *C R Biol*. 2004;327: 603–607. doi:10.1016/j.crv.2004.04.005
82. Reid DM, Gow NA, Brown GD. Pattern recognition: recent insights from Dectin-1. *Curr Opin Immunol*. 2009;21: 30–37. doi:10.1016/j.coi.2009.01.003

83. Gross O, Gewies A, Finger K, Schäfer M, Sparwasser T, Peschel C, et al. Card9 controls a non-TLR signalling pathway for innate anti-fungal immunity. *Nature*. 2006;442: 651–656. doi:10.1038/nature04926
84. Gantner BN, Simmons RM, Canavera SJ, Akira S, Underhill DM. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and Toll-like receptor 2. *J Exp Med*. 2003;197: 1107–1117. doi:10.1084/jem.20021787
85. van de Veerdonk FL, Kullberg BJ, van der Meer JW, Gow NA, Netea MG. Host–microbe interactions: innate pattern recognition of fungal pathogens. *Curr Opin Microbiol*. 2008;11: 305–312. doi:10.1016/j.mib.2008.06.002
86. Zhang J, Zhu J, Imrich A, Cushion M, Kinane TB, Koziel H. Pneumocystis activates human alveolar macrophage NF-kappaB signaling through mannose receptors. *Infect Immun*. 2004;72: 3147–3160. doi:10.1128/IAI.72.6.3147-3160.2004
87. Chen G, Shaw MH, Kim Y-G, Nuñez G. NOD-Like Receptors: Role in Innate Immunity and Inflammatory Disease. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2009;4: 365–398. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092239
88. Ogura Y, Inohara N, Benito A, Chen FF, Yamaoka S, Nunez G. Nod2, a Nod1/Apaf-1 family member that is restricted to monocytes and activates NF-kappaB. *J Biol Chem*. 2001;276: 4812–4818. doi:10.1074/jbc.M008072200
89. Tada H, Aiba S, Shibata K-I, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun*. 2005;73: 7967–7976. doi:10.1128/IAI.73.12.7967-7976.2005
90. Antosz H, Osiak M. NOD1 and NOD2 receptors: integral members of the innate and adaptive immunity system. *Acta Biochim Pol*. 2013;60: 351–360.
91. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The inflammasome: a molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL-beta. *Mol Cell*. 2002;10: 417–426.
92. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 forms an IL-1beta-processing inflammasome with increased activity in Muckle-Wells autoinflammatory disorder. *Immunity*. 2004;20: 319–325.
93. Hsu Y-MS, Zhang Y, You Y, Wang D, Li H, Duramad O, et al. The adaptor protein CARD9 is required for innate immune responses to intracellular pathogens. *Nat Immunol*. 2007;8: 198–205. doi:10.1038/ni1426
94. van Heel DA, Ghosh S, Butler M, Hunt K, Foxwell BMJ, Mengin-Lecreulx D, et al. Synergistic enhancement of Toll-like receptor responses by NOD1 activation. *Eur J Immunol*. 2005;35: 2471–2476. doi:10.1002/eji.200526296
95. Netea MG, Ferwerda G, de Jong DJ, Werts C, Boneca IG, Jéhanno M, et al. The frameshift mutation in Nod2 results in unresponsiveness not only to Nod2- but also

- Nod1-activating peptidoglycan agonists. *J Biol Chem.* 2005;280: 35859–35867. doi:10.1074/jbc.M504924200
96. Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002;14: 123–128. doi:10.1016/S0952-7915(01)00307-7
 97. Greaves DR, Gordon S. Thematic review series: The Immune System and Atherogenesis. Recent insights into the biology of macrophage scavenger receptors. *J Lipid Res.* 2005;46: 11–20. doi:10.1194/jlr.R400011-JLR200
 98. Peiser L, Gordon S. The function of scavenger receptors expressed by macrophages and their role in the regulation of inflammation. *Microbes Infect.* 2001;3: 149–159. doi:10.1016/S1286-4579(00)01362-9
 99. Weis WI, Taylor ME, Drickamer K. The C-type lectin superfamily in the immune system. *Immunol Rev.* 1998;163: 19–34. doi:10.1111/j.1600-065X.1998.tb01185.x
 100. Gahmberg CG, Valmu L, Fagerholm S, Kotovuori P, Ihanus E, Tian L, et al. Leukocyte integrins and inflammation. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 1998;54: 549–555. doi:10.1007/s000180050183
 101. Mahalingam S, Karupiah G. Chemokines and chemokine receptors in infectious diseases. *Immunol Cell Biol.* 1999;77: 469–475. doi:10.1046/j.1440-1711.1999.00858.x
 102. Brown GD, Gordon S. Phagocytes and Anti-Infective Immunity. In: Sher A, Ahmed R, Kaufmann SHE, editors. *Immunology of Infectious Diseases.* American Society of Microbiology; 2002. pp. 79–92. Available: <http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555817978.chap6>
 103. Nimmerjahn F, Ravetch JV. Fcγ Receptors: Old Friends and New Family Members. *Immunity.* 2006;24: 19–28. doi:10.1016/j.immuni.2005.11.010
 104. Ravetch JV. Fc receptors. *Curr Opin Immunol.* 1997;9: 121–125. doi:10.1016/S0952-7915(97)80168-9
 105. Underhill DM, Goodridge HS. Information processing during phagocytosis. *Nat Rev Immunol.* 2012;12: 492–502. doi:10.1038/nri3244
 106. Greenberg S, Grinstein S. Phagocytosis and innate immunity. *Curr Opin Immunol.* 2002;14: 136–145. doi:10.1016/S0952-7915(01)00309-0
 107. Lee WL, Harrison RE, Grinstein S. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* 2003;5: 1299–1306. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.014
 108. Swanson JA, Baer SC. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biol.* 1995;5: 89–93. doi:10.1016/S0962-8924(00)88956-4
 109. Sun-Wada G-H, Tabata H, Kawamura N, Aoyama M, Wada Y. Direct recruitment of H⁺-ATPase from lysosomes for phagosomal acidification. *J Cell Sci.* 2009;122: 2504–2513. doi:10.1242/jcs.050443

110. Claus V, Jahraus A, Tjelle T, Berg T, Kirschke H, Faulstich H, et al. Lysosomal enzyme trafficking between phagosomes, endosomes, and lysosomes in J774 macrophages. Enrichment of cathepsin H in early endosomes. *J Biol Chem.* 1998;273: 9842–9851.
111. Sander LE, Davis MJ, Boekschoten MV, Amsen D, Dascher CC, Ryffel B, et al. Detection of prokaryotic mRNA signifies microbial viability and promotes immunity. *Nature.* 2011;474: 385–389. doi:10.1038/nature10072
112. Bedard K, Krause K-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2007;87: 245–313. doi:10.1152/physrev.00044.2005
113. Johansson A, Dahlgren C. Differentiation of human peripheral blood monocytes to macrophages is associated with changes in the cellular respiratory burst activity. *Cell Biochem Funct.* 1992;10: 87–93. doi:10.1002/cbf.290100204
114. Frucht DM, Fukao T, Bogdan C, Schindler H, O’Shea JJ, Koyasu S. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 2001;22: 556–560.
115. Flannagan RS, Cosío G, Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7: 355–366. doi:10.1038/nrmicro2128
116. Ciaccia L. Fundamentals of Inflammation. *Yale J Biol Med.* 2011;84: 64–65.
117. Zhang J-M, An J. Cytokines, Inflammation and Pain. *Int Anesthesiol Clin.* 2007;45: 27–37. doi:10.1097/AIA.0b013e318034194e
118. Borish LC, Steinke JW. 2. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol.* 2003;111: S460-475.
119. Schindler C, J. E. Darnell J. Transcriptional Responses to Polypeptide Ligands: The JAK-STAT Pathway. *Annu Rev Biochem.* 1995;64: 621–652. doi:10.1146/annurev.bi.64.070195.003201
120. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3: 133–146. doi:10.1038/nri1001
121. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J Interferon Cytokine Res.* 2009;29: 313–326. doi:10.1089/jir.2008.0027
122. Tanaka T, Narazaki M, Kishimoto T. IL-6 in Inflammation, Immunity, and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2014;6: a016295. doi:10.1101/cshperspect.a016295
123. Dinarello CA. Immunological and Inflammatory Functions of the Interleukin-1 Family. *Annu Rev Immunol.* 2009;27: 519–550. doi:10.1146/annurev.immunol.021908.132612
124. Filippo KD, Henderson RB, Laschinger M, Hogg N. Neutrophil Chemokines KC and Macrophage-Inflammatory Protein-2 Are Newly Synthesized by Tissue Macrophages

- Using Distinct TLR Signaling Pathways. *J Immunol.* 2008;180: 4308–4315. doi:10.4049/jimmunol.180.6.4308
125. LeibundGut-Landmann S, Groß O, Robinson MJ, Osorio F, Slack EC, Tsoni SV, et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol.* 2007;8: 630–638. doi:10.1038/ni1460
 126. Kuga S, Otsuka T, Niino H, Nunoi H, Nemoto Y, Nakano T, et al. Suppression of superoxide anion production by interleukin-10 is accompanied by a downregulation of the genes for subunit proteins of NADPH oxidase. *Exp Hematol.* 1996;24: 151–157.
 127. Evans JH, Spencer DM, Zweifach A, Leslie CC. Intracellular Calcium Signals Regulating Cytosolic Phospholipase A2 Translocation to Internal Membranes. *J Biol Chem.* 2001;276: 30150–30160. doi:10.1074/jbc.M100943200
 128. Funk CD. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. *Science.* 2001;294: 1871–1875. doi:10.1126/science.294.5548.1871
 129. Yoshikai Y. Roles of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection. *Curr Opin Infect Dis.* 2001;14: 257–263.
 130. Serhan CN. Novel lipid mediators and resolution mechanisms in acute inflammation: to resolve or not? *Am J Pathol.* 2010;177: 1576–1591. doi:10.2353/ajpath.2010.100322
 131. Soehnlein O, Lindbom L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010;10: 427–439. doi:10.1038/nri2779
 132. Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol.* 2007;7: 678–689. doi:10.1038/nri2156
 133. Wengner AM, Pitchford SC, Furze RC, Rankin SM. The coordinated action of G-CSF and ELR + CXC chemokines in neutrophil mobilization during acute inflammation. *Blood.* 2008;111: 42–49. doi:10.1182/blood-2007-07-099648
 134. Borregaard N. Neutrophils, from Marrow to Microbes. *Immunity.* 2010;33: 657–670. doi:10.1016/j.immuni.2010.11.011
 135. Semerad CL, Liu F, Gregory AD, Stumpf K, Link DC. G-CSF Is an Essential Regulator of Neutrophil Trafficking from the Bone Marrow to the Blood. *Immunity.* 2002;17: 413–423. doi:10.1016/S1074-7613(02)00424-7
 136. Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;11: 762–774. doi:10.1038/nri3070
 137. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev.* 2000;177: 195–203. doi:10.1034/j.1600-065X.2000.17706.x
 138. Mócsai A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. *J Exp Med.* 2013;210: 1283–1299. doi:10.1084/jem.20122220

139. Roos D, van Bruggen R, Meischl C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 2003;5: 1307–1315. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.009
140. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* 2006;6: 173–182. doi:10.1038/nri1785
141. Faurschou M, Borregaard N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* 2003;5: 1317–1327. doi:10.1016/j.micinf.2003.09.008
142. Borregaard N, Sørensen OE, Theilgaard-Mönch K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. *Trends Immunol.* 2007;28: 340–345. doi:10.1016/j.it.2007.06.002
143. Soehnlein O, Lindbom L, Weber C. Mechanisms underlying neutrophil-mediated monocyte recruitment. *Blood.* 2009;114: 4613–4623. doi:10.1182/blood-2009-06-221630
144. Soehnlein O, Weber C, Lindbom L. Neutrophil granule proteins tune monocytic cell function. *Trends Immunol.* 2009;30: 538–546. doi:10.1016/j.it.2009.06.006
145. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2011;11: 519–531. doi:10.1038/nri3024
146. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005;6: 1191–1197. doi:10.1038/ni1276
147. Serhan CN, Yacoubian S, Yang R. Anti-Inflammatory and Pro-Resolving Lipid Mediators. *Annu Rev Pathol.* 2008;3: 279–312. doi:10.1146/annurev.pathmechdis.3.121806.151409
148. Ariel A, Fredman G, Sun Y-P, Kantarci A, Van Dyke TE, Luster AD, et al. Apoptotic neutrophils and T cells sequester chemokines during immune response resolution through modulation of CCR5 expression. *Nat Immunol.* 2006;7: 1209–1216. doi:10.1038/ni1392
149. Fox S, Leitch AE, Duffin R, Haslett C, Rossi AG. Neutrophil Apoptosis: Relevance to the Innate Immune Response and Inflammatory Disease. *J Innate Immun.* 2010;2: 216–227. doi:10.1159/000284367
150. Korn D, Frasch SC, Fernandez-Boyanapalli R, Henson PM, Bratton DL. Modulation of Macrophage Efferocytosis in Inflammation. *Front Immunol.* 2011;2. doi:10.3389/fimmu.2011.00057
151. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol.* 2008;8: 958–969. doi:10.1038/nri2448
152. Jaguin M, Houlbert N, Fardel O, Lecureur V. Polarization profiles of human M-CSF-generated macrophages and comparison of M1-markers in classically activated macrophages from GM-CSF and M-CSF origin. *Cell Immunol.* 2013;281: 51–61. doi:10.1016/j.cellimm.2013.01.010

153. Gordon S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol.* 2003;3: 23–35. doi:10.1038/nri978
154. Duluc D, Delneste Y, Tan F, Moles M-P, Grimaud L, Lenoir J, et al. Tumor-associated leukemia inhibitory factor and IL-6 skew monocyte differentiation into tumor-associated macrophage-like cells. *Blood.* 2007;110: 4319–4330. doi:10.1182/blood-2007-02-072587
155. Davis MJ, Tsang TM, Qiu Y, Dayrit JK, Freij JB, Huffnagle GB, et al. Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *mBio.* 2013;4: e00264-213. doi:10.1128/mBio.00264-13
156. Cheong C, Matos I, Choi J-H, Dandamudi DB, Shrestha E, Longhi MP, et al. Microbial stimulation fully differentiates monocytes to DC-SIGN/CD209+ dendritic cells for immune T cell areas. *Cell.* 2010;143: 416–429. doi:10.1016/j.cell.2010.09.039
157. Pamer E, Cresswell P. Mechanisms of Mhc Class I-Restricted Antigen Processing. *Annu Rev Immunol.* 1998;16: 323–358. doi:10.1146/annurev.immunol.16.1.323
158. Jensen PE. Mechanisms of Antigen Presentation. *Clin Chem Lab Med.* 2005;37: 179–186. doi:10.1515/CCLM.1999.034
159. Robey E, Allison JP. T-cell activation: integration of signals from the antigen receptor and costimulatory molecules. *Immunol Today.* 1995;16: 306–310. doi:10.1016/0167-5699(95)80140-5
160. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1986;136: 2348–2357.
161. Martinez GJ, Nurieva RI, Yang XO, Dong C. Regulation and function of proinflammatory TH17 cells. *Ann N Y Acad Sci.* 2008;1143: 188–211. doi:10.1196/annals.1443.021
162. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, Mattson JD, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol.* 2007;8: 950–957. doi:10.1038/ni1497
163. Volpe E, Servant N, Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, et al. A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat Immunol.* 2008;9: 650–657. doi:10.1038/ni.1613
164. Fouser LA, Wright JF, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M. Th17 cytokines and their emerging roles in inflammation and autoimmunity. *Immunol Rev.* 2008;226: 87–102. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00712.x
165. Essakalli M, Brick C, Bennani N, Benseffaj N, Ouadghiri S, Atouf O. Le lymphocyte TH17 dernier-né de la famille des lymphocytes T CD4+. *Pathol Biol.* 2010;58: 437–443. doi:10.1016/j.patbio.2009.01.001

166. Saijo S, Ikeda S, Yamabe K, Kakuta S, Ishigame H, Akitsu A, et al. Dectin-2 Recognition of α -Mannans and Induction of Th17 Cell Differentiation Is Essential for Host Defense against *Candida albicans*. *Immunity*. 2010;32: 681–691. doi:10.1016/j.immuni.2010.05.001
167. Pène J, Chevalier S, Preisser L, Vénéreau E, Guilleux M-H, Ghannam S, et al. Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008;180: 7423–7430.
168. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. *Immunity*. 2006;24: 677–688. doi:10.1016/j.immuni.2006.06.002
169. Iwakura Y, Nakae S, Saijo S, Ishigame H. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. *Immunol Rev*. 2008;226: 57–79. doi:10.1111/j.1600-065X.2008.00699.x
170. Klis FM, Boorsma A, De Groot PWJ. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2006;23: 185–202. doi:10.1002/yea.1349
171. Ruiz-Herrera J, Elorza MV, Valentín E, Sentandreu R. Molecular organization of the cell wall of *Candida albicans* and its relation to pathogenicity. *FEMS Yeast Res*. 2006;6: 14–29. doi:10.1111/j.1567-1364.2005.00017.x
172. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NAR. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6: 67–78. doi:10.1038/nrmicro1815
173. Netea MG. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J Clin Invest*. 2006;116: 1642–1650. doi:10.1172/JCI27114
174. Lipke PN, Ovalle R. Cell Wall Architecture in Yeast: New Structure and New Challenges. *J Bacteriol*. 1998;180: 3735–3740.
175. Aguilar-Uscanga B, François J m. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol*. 2003;37: 268–274. doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01394.x
176. Levitz SM. Innate Recognition of Fungal Cell Walls. *PLoS Pathog*. 2010;6. doi:10.1371/journal.ppat.1000758
177. Perez-Garcia LA. Role of Cell Wall Polysaccharides during Recognition of *Candida albicans* by the Innate Immune System. *J Glycobiol*. 2012;1. doi:10.4172/2168-958X.1000102
178. Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. 2002;26: 239–256. doi:10.1111/j.1574-6976.2002.tb00613.x
179. Orlean P. Architecture and Biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall. *Genetics*. 2012;192: 775–818. doi:10.1534/genetics.112.144485

180. Lesage G, Bussey H. Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2006;70: 317–343. doi:10.1128/MMBR.00038-05
181. Adriana Catalli MK. Chitin and-Glucan Polysaccharides as Immunomodulators of Airway Inflammation and Atopic Disease. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov.* 2010;4: 175–189. doi:10.2174/1872214811004030175
182. Adams EL, Rice PJ, Graves B, Ensley HE, Yu H, Brown GD, et al. Differential High-Affinity Interaction of Dectin-1 with Natural or Synthetic Glucans Is Dependent upon Primary Structure and Is Influenced by Polymer Chain Length and Side-Chain Branching. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008;325: 115–123. doi:10.1124/jpet.107.133124
183. VANNUCCI L, KRIZAN J, SIMA P, STAKHEEV D, CAJA F, RAJSIGLOVA L, et al. Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans. *Int J Oncol.* 2013;43: 357–364. doi:10.3892/ijo.2013.1974
184. Rappleye CA, Eissenberg LG, Goldman WE. *Histoplasma capsulatum* α -(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the β -glucan receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104: 1366–1370. doi:10.1073/pnas.0609848104
185. Fontaine T, Simenel C, Dubreucq G, Adam O, Delepierre M, Lemoine J, et al. Molecular organization of the alkali-insoluble fraction of *Aspergillus fumigatus* cell wall. *J Biol Chem.* 2000; doi:10.1074/jbc.M909975199
186. McIntosh M, Stone BA, Stanisich VA. Curdlan and other bacterial (1→3)- β -d-glucans. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005;68: 163–173. doi:10.1007/s00253-005-1959-5
187. Schmid F, Stone BA, McDougall BM, Bacic A, Martin KL, Brownlee RTC, et al. Structure of epiglucan, a highly side-chain/branched (1→3;1→6)- β -glucan from the micro fungus *Epicoccum nigrum* Ehrenb. ex Schlecht. *Carbohydr Res.* 2001;331: 163–171. doi:10.1016/S0008-6215(01)00023-4
188. Chema B, Fabienne F, Guilhem J, Jacqueline D, Luc W, Michel P, et al. Structural Characterization, Technological Functionality and Physiological Aspects of Fungal β -D-Glucans: A Review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2015;0: 00–00. doi:10.1080/10408398.2013.854733
189. Zeković DB, Kwiatkowski S, Vrvic MM, Jakovljević D, Moran CA. Natural and Modified (1→3)- β -D-Glucans in Health Promotion and Disease Alleviation. *Crit Rev Biotechnol.* 2005;25: 205–230. doi:10.1080/07388550500376166
190. Pillemer L, Ecker EE. Anticomplementary Factor in Fresh Yeast. *J Biol Chem.* 1941;137: 139–142.
191. Carlo FJD, Fiore JV. On the Composition of Zymosan. *Science.* 1958;127: 756–757. doi:10.1126/science.127.3301.756-a
192. Yan J, Allendorf DJ, Brandley B. Yeast whole glucan particle (WGP) beta-glucan in conjunction with antitumour monoclonal antibodies to treat cancer. *Expert Opin Biol Ther.* 2005;5: 691–702. doi:10.1517/14712598.5.5.691

193. Synytsya A, Novák M. Structural diversity of fungal glucans. *Carbohydr Polym.* 2013;92: 792–809. doi:10.1016/j.carbpol.2012.09.077
194. Byun E-H, Kim J-H, Sung N-Y, Choi J, Lim S-T, Kim K-H, et al. Effects of gamma irradiation on the physical and structural properties of β -glucan. *Radiat Phys Chem.* 2008;77: 781–786. doi:10.1016/j.radphyschem.2007.12.008
195. Ohno N, Uchiyama M, Tsuzuki A, Tokunaka K, Miura NN, Adachi Y, et al. Solubilization of yeast cell-wall beta-(1 \rightarrow 3)-D-glucan by sodium hypochlorite oxidation and dimethyl sulfoxide extraction. *Carbohydr Res.* 1999;316: 161–172.
196. Munro CA, Winter K, Buchan A, Henry K, Becker JM, Brown AJP, et al. Chs1 of *Candida albicans* is an essential chitin synthase required for synthesis of the septum and for cell integrity. *Mol Microbiol.* 2001;39: 1414–1426. doi:10.1046/j.1365-2958.2001.02347.x
197. Bowman SM, Free SJ. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays.* 2006;28: 799–808. doi:10.1002/bies.20441
198. Kurita K. Chitin and Chitosan: Functional Biopolymers from Marine Crustaceans. *Mar Biotechnol.* 2006;8: 203–226. doi:10.1007/s10126-005-0097-5
199. Kollár R, Reinhold BB, Petráková E, Yeh HJC, Ashwell G, Drgonová J, et al. Architecture of the Yeast Cell Wall β (1 \rightarrow 6)-GLUCAN INTERCONNECTS MANNOPROTEIN, β (1 \rightarrow 3)-GLUCAN, AND CHITIN. *J Biol Chem.* 1997;272: 17762–17775. doi:10.1074/jbc.272.28.17762
200. Carlström D. THE CRYSTAL STRUCTURE OF α -CHITIN (POLY-N-ACETYL-D-GLUCOSAMINE). *J Biophys Biochem Cytol.* 1957;3: 669–683.
201. Banks IR, Specht CA, Donlin MJ, Gerik KJ, Levitz SM, Lodge JK. A Chitin Synthase and Its Regulator Protein Are Critical for Chitosan Production and Growth of the Fungal Pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 2005;4: 1902–1912. doi:10.1128/EC.4.11.1902-1912.2005
202. Tharanathan RN, Kittur FS. Chitin--the undisputed biomolecule of great potential. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2003;43: 61–87. doi:10.1080/10408690390826455
203. Kim S-K. Chitin, Chitosan, Oligosaccharides and Their Derivatives: Biological Activities and Applications. CRC Press; 2010.
204. Baker LG, Specht CA, Donlin MJ, Lodge JK. Chitosan, the Deacetylated Form of Chitin, Is Necessary for Cell Wall Integrity in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell.* 2007;6: 855–867. doi:10.1128/EC.00399-06
205. Chaffin WL, López-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martínez JP. Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans*: Identification, Function, and Expression. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998;62: 130–180.
206. Gemmill TR, Trimble RB. Overview of N- and O-linked oligosaccharide structures found in various yeast species. *Biochim Biophys Acta BBA - Gen Subj.* 1999;1426: 227–237. doi:10.1016/S0304-4165(98)00126-3

207. Mora-Montes HM, Ponce-Noyola P, Villagómez-Castro JC, Gow NA, Flores-Carreón A, López-Romero E. Protein glycosylation in *Candida*. *Future Microbiol.* 2009;4: 1167–1183. doi:10.2217/fmb.09.88
208. Cutler JE. N-glycosylation of yeast, with emphasis on *Candida albicans*. *Med Mycol.* 2001;39 Suppl 1: 75–86.
209. De Groot PWJ, Ram AF, Klis FM. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol.* 2005;42: 657–675. doi:10.1016/j.fgb.2005.04.002
210. Latgé JP, Kobayashi H, Debeauvais JP, Diaquin M, Sarfati J, Wieruszeski JM, et al. Chemical and immunological characterization of the extracellular galactomannan of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun.* 1994;62: 5424–5433.
211. Poulain D, Slomianny C, Jouault T, Gomez JM, Trinel PA. Contribution of Phospholipomannan to the Surface Expression of β -1,2-Oligomannosides in *Candida albicans* and Its Presence in Cell Wall Extracts. *Infect Immun.* 2002;70: 4323–4328. doi:10.1128/IAI.70.8.4323-4328.2002
212. Trinel P-A, Plancke Y, Gerold P, Jouault T, Delplace F, Schwarz RT, et al. The *Candida albicans* Phospholipomannan Is a Family of Glycolipids Presenting Phosphoinositolmannosides with Long Linear Chains of β -1,2-Linked Mannose Residues. *J Biol Chem.* 1999;274: 30520–30526. doi:10.1074/jbc.274.43.30520
213. Jouault T, Fradin C, Trinel P-A, Bernigaud A, Poulain D. Early Signal Transduction Induced by *Candida albicans* in Macrophages through Shedding of a Glycolipid. *J Infect Dis.* 1998;178: 792–802. doi:10.1086/515361
214. Jouault T, Behi MEA-E, Martínez-Esparza M, Breuilh L, Trinel P-A, Chamailard M, et al. Specific Recognition of *Candida albicans* by Macrophages Requires Galectin-3 to Discriminate *Saccharomyces cerevisiae* and Needs Association with TLR2 for Signaling. *J Immunol.* 2006;177: 4679–4687. doi:10.4049/jimmunol.177.7.4679
215. Hunter K w., Gault R a., Berner M d. Preparation of microparticulate β -glucan from *Saccharomyces cerevisiae* for use in immune potentiation. *Lett Appl Microbiol.* 2002;35: 267–271. doi:10.1046/j.1472-765X.2002.01201.x
216. Ohno N. Structure and biological activities of hypochlorite oxidized zymosan. *Carbohydr Polym.* 2001;44: 339–349. doi:10.1016/S0144-8617(00)00250-2
217. Freimund S, Sauter M, Käppeli O, Dutler H. A new non-degrading isolation process for 1,3- β -d-glucan of high purity from baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr Polym.* 2003;54: 159–171. doi:10.1016/S0144-8617(03)00162-0
218. Jaehrig SC, Rohn S, Kroh LW, Wildenauer FX, Lisdat F, Fleischer L-G, et al. Antioxidative activity of (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 6)- β -d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae* grown on different media. *LWT - Food Sci Technol.* 2008;41: 868–877. doi:10.1016/j.lwt.2007.06.004

219. Liu X, Wang Q, Cui S, Liu H. A new isolation method of β -d-glucans from spent yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Hydrocoll.* 2008;22: 239–247. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.11.008
220. Thammakiti S, Supphantharika M, Phaesuwan T, Verduyn C. Preparation of spent brewer's yeast β -glucans for potential applications in the food industry. *Int J Food Sci Technol.* 2004;39: 21–29. doi:10.1111/j.1365-2621.2004.00742.x
221. Wang Y, Yao S, Wu T. Combination of induced autolysis and sodium hypochlorite oxidation for the production of *Saccharomyces cerevisiae* (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan. *World J Microbiol Biotechnol.* 2003;19: 947–952. doi:10.1023/B:WIBI.0000007328.21451.78
222. Isolation of β -(1-3)-D-glucan from baker's yeast by acid-alkali method--《INDUSTRIAL MICROBIOLOGY》2000年01期 [Internet]. [cited 18 Mar 2016]. Available: http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotal-GYWS200001007.htm
223. Laroche C, Michaud P. New Developments and Prospective Applications for (1,3) Glucans. *Recent Pat Biotechnol.* 2007;1: 59–73. doi:10.2174/187220807779813938
224. Tada R, Harada T, Nagi-Miura N, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, et al. NMR characterization of the structure of a β -(1 \rightarrow 3)-d-glucan isolate from cultured fruit bodies of *Sparassis crispa*. *Carbohydr Res.* 2007;342: 2611–2618. doi:10.1016/j.carres.2007.08.016
225. Müller A, Ensley H, Pretus H, McNamee R, Jones E, McLaughlin E, et al. The application of various protic acids in the extraction of (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr Res.* 1997;299: 203–208. doi:10.1016/S0008-6215(97)00004-9
226. Chihara G, Hamuro J, Maeda Y, Arai Y, Fukuoka F. Antitumor polysaccharide derived chemically from natural glucan (pachyman). *Nature.* 1970;225: 943–944.
227. Tumor inhibition in *Boletus edulis* and other *Holobasidiomycetes* [Internet]. [cited 20 Mar 2016]. Available: https://www.researchgate.net/publication/260237574_Tumor_inhibition_in_Boletus_edulis_and_other_Holobasidiomycetes
228. Vetvicka V, Yvin J-C. Effects of marine beta-1,3 glucan on immune reactions. *Int Immunopharmacol.* 2004;4: 721–730. doi:10.1016/j.intimp.2004.02.007
229. Kobayashi H, Yoshida R, Kanada Y, Fukuda Y, Yagyu T, Inagaki K, et al. Suppressing effects of daily oral supplementation of beta-glucan extracted from *Agaricus blazei* Murill on spontaneous and peritoneal disseminated metastasis in mouse model. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005;131: 527–538. doi:10.1007/s00432-005-0672-1
230. Ooi VE, Liu F. Immunomodulation and anti-cancer activity of polysaccharide-protein complexes. *Curr Med Chem.* 2000;7: 715–729.

231. Rice PJ, Kelley JL, Kogan G, Ensley HE, Kalbfleisch JH, Browder IW, et al. Human monocyte scavenger receptors are pattern recognition receptors for (1→3)-β-D-glucans. *J Leukoc Biol.* 2002;72: 140–146.
232. Borchers AT, Keen CL, Gershwin ME. Mushrooms, tumors, and immunity: an update. *Exp Biol Med Maywood NJ.* 2004;229: 393–406.
233. Mizuno M, Morimoto M, Minato K, Tsuchida H. Polysaccharides from *Agaricus blazei* stimulate lymphocyte T-cell subsets in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 1998;62: 434–437. doi:10.1271/bbb.62.434
234. Pinheiro F, Faria RR, de Camargo JLV, Spinardi-Barbisan ALT, da Eira AF, Barbisan LF. Chemoprevention of preneoplastic liver foci development by dietary mushroom *Agaricus blazei* Murrill in the rat. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2003;41: 1543–1550.
235. Sogui MM, Alves de Lima PL, Delmanto RD, da Eira AF, Salvadori DMF, Ribeiro LR. Antimutagenic effect of *Lentinula edodes* (BERK.) Pegler mushroom and possible variation among lineages. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol Res Assoc.* 2003;41: 555–560.
236. Lemieszek M, Rzeski W. Anticancer properties of polysaccharides isolated from fungi of the Basidiomycetes class. *Contemp Oncol.* 2012;16: 285–289. doi:10.5114/wo.2012.30055
237. Hsieh T, Wu P, Park S, Wu JM. Induction of cell cycle changes and modulation of apoptogenic/anti-apoptotic and extracellular signaling regulatory protein expression by water extracts of I'm-Yunity™ (PSP). *BMC Complement Altern Med.* 2006;6: 30. doi:10.1186/1472-6882-6-30
238. Ishihara Y, Fujii T, Iijima H, Saito K, Matsunaga K. The role of neutrophils as cytotoxic cells in lung metastasis: suppression of tumor cell metastasis by a biological response modifier (PSK). *Vivo Athens Greece.* 1998;12: 175–182.
239. Fujimiya Y, Suzuki Y, Oshiman K, Kobori H, Moriguchi K, Nakashima H, et al. Selective tumoricidal effect of soluble proteoglycan extracted from the basidiomycete, *Agaricus blazei* Murill, mediated via natural killer cell activation and apoptosis. *Cancer Immunol Immunother CII.* 1998;46: 147–159.
240. Lee I-S, Nishikawa A. *Polyozellus multiplex*, a Korean wild mushroom, as a potent chemopreventive agent against stomach cancer. *Life Sci.* 2003;73: 3225–3234.
241. Hong F, Yan J, Baran JT, Allendorf DJ, Hansen RD, Ostroff GR, et al. Mechanism by which orally administered beta-1,3-glucans enhance the tumoricidal activity of antitumor monoclonal antibodies in murine tumor models. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004;173: 797–806.
242. Strong K, Mathers C, Leeder S, Beaglehole R. Preventing chronic diseases: how many lives can we save? *Lancet Lond Engl.* 2005;366: 1578–1582. doi:10.1016/S0140-6736(05)67341-2

243. Kapur NK, Ashen D, Blumenthal RS. High density lipoprotein cholesterol: an evolving target of therapy in the management of cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag.* 2008;4: 39–57.
244. Petravić-Tominac V, Zechner-Krpan V, Grba S, Srećec S, Panjkota-Krbavčić I, Vidović L. Biological Effects of Yeast β -Glucans. *Agric Conspec Sci ACS.* 2010;75: 149–158.
245. Lim M-K, Ku S-K, Choi J-S, Kim J-W. Effect of polycan, a β -glucan originating from *Aureobasidium*, on a high-fat diet-induced hyperlipemic hamster model. *Exp Ther Med.* 2015;9: 1369–1378. doi:10.3892/etm.2015.2238
246. Wang S, Zhou H, Feng T, Wu R, Sun X, Guan N, et al. β -Glucan attenuates inflammatory responses in oxidized LDL-induced THP-1 cells via the p38 MAPK pathway. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2014;24: 248–255. doi:10.1016/j.numecd.2013.09.019
247. Lo H-C, Tsai F-A, Wasser SP, Yang J-G, Huang B-M. Effects of ingested fruiting bodies, submerged culture biomass, and acidic polysaccharide glucuronoxylomannan of *Tremella mesenterica* Retz.:Fr. on glycemic responses in normal and diabetic rats. *Life Sci.* 2006;78: 1957–1966. doi:10.1016/j.lfs.2005.08.033
248. Kiho T, Kobayashi T, Morimoto H, Usui S, Ukai S, Hirano K, et al. Structural features of an anti-diabetic polysaccharide (TAP) from *Tremella aurantia*. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2000;48: 1793–1795.
249. Kiho T, Morimoto H, Sakushima M, Usui S, Ukai S. Polysaccharides in fungi. XXXV. Anti diabetic activity of an acidic polysaccharide from the fruiting bodies of *Tremella aurantia*. *Biol Pharm Bull.* 1995;18: 1627–1629.
250. Mayell M. Maitake extracts and their therapeutic potential. *Altern Med Rev J Clin Ther.* 2001;6: 48–60.
251. Kim Y-W, Kim K-H, Choi H-J, Lee D-S. Anti-diabetic activity of beta-glucans and their enzymatically hydrolyzed oligosaccharides from *Agaricus blazei*. *Biotechnol Lett.* 2005;27: 483–487. doi:10.1007/s10529-005-2225-8
252. Karumuthil-Melethil S, Gudi R, Johnson BM, Perez N, Vasu C. Fungal β -glucan, a Dectin-1 ligand, promotes protection from type 1 diabetes by inducing regulatory innate immune response. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2014;193: 3308–3321. doi:10.4049/jimmunol.1400186
253. Tam SC, Yip KP, Fung KP, Chang ST. Hypotensive and renal effects of an extract of the edible mushroom *Pleurotus sajor-caju*. *Life Sci.* 1986;38: 1155–1161.
254. HAGIWARA S, TAKAHASHI M, SHEN Y, KAIHOU S, TOMIYAMA T, YAZAWA M, et al. A Phytochemical in the Edible Tamogi-take Mushroom (*Pleurotus cornucopiae*), D-Mannitol, Inhibits ACE Activity and Lowers the Blood Pressure of Spontaneously Hypertensive Rats. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2005;69: 1603–1605. doi:10.1271/bbb.69.1603

255. Talpur NA, Echard BW, Fan AY, Jaffari O, Bagchi D, Preuss HG. Antihypertensive and metabolic effects of whole Maitake mushroom powder and its fractions in two rat strains. *Mol Cell Biochem.* 2002;237: 129–136.
256. Wei D, Zhang L, Williams DL, Browder IW. Glucan stimulates human dermal fibroblast collagen biosynthesis through a nuclear factor-1 dependent mechanism. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* 2002;10: 161–168.
257. Kwiatkowski S, Edgar S. Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) Glucan Polysaccharides – Occurrence, Separation and Application in Food, Feed and Health Industries. In: Karunaratne DN, editor. *The Complex World of Polysaccharides.* InTech; 2012. Available: <http://www.intechopen.com/books/the-complex-world-of-polysaccharides/yeast-saccharomyces-cerevisiae-glucan-polysaccharides-occurrence-separation-and-application-in-food->
258. Tang C, Kamiya T, Liu Y, Kadoki M, Kakuta S, Oshima K, et al. Inhibition of Dectin-1 Signaling Ameliorates Colitis by Inducing Lactobacillus-Mediated Regulatory T Cell Expansion in the Intestine. *Cell Host Microbe.* 2015;18: 183–197. doi:10.1016/j.chom.2015.07.003
259. Kakumu S, Ishikawa T, Wakita T, Yoshioka K, Ito Y, Shinagawa T. Effect of sizofiran, a polysaccharide, on interferon gamma, antibody production and lymphocyte proliferation specific for hepatitis B virus antigen in patients with chronic hepatitis B. *Int J Immunopharmacol.* 1991;13: 969–975.
260. Vetvicka V, Vetvickova J. Physiological effects of different types of beta-glucan. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacký Olomouc Czechoslov.* 2007;151: 225–231.
261. Ara Y, Saito T, Takagi T, Hagiwara E, Miyagi Y, Sugiyama M, et al. Zymosan enhances the immune response to DNA vaccine for human immunodeficiency virus type-1 through the activation of complement system. *Immunology.* 2001;103: 98–105.
262. Jung K, Ha Y, Ha S-K, Han DU, Kim D-W, Moon WK, et al. Antiviral effect of *Saccharomyces cerevisiae* beta-glucan to swine influenza virus by increased production of interferon-gamma and nitric oxide. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2004;51: 72–76. doi:10.1111/j.1439-0450.2004.00732.x
263. Saijo S, Fujikado N, Furuta T, Chung S, Kotaki H, Seki K, et al. Dectin-1 is required for host defense against *Pneumocystis carinii* but not against *Candida albicans*. *Nat Immunol.* 2007;8: 39–46. doi:10.1038/ni1425
264. Herre J, Willment JA, Gordon S, Brown GD. The role of Dectin-1 in antifungal immunity. *Crit Rev Immunol.* 2004;24: 193–203.
265. Hahn PY, Evans SE, Kottom TJ, Standing JE, Pagano RE, Limper AH. *Pneumocystis carinii* Cell Wall β -Glucan Induces Release of Macrophage Inflammatory Protein-2 from Alveolar Epithelial Cells via a Lactosylceramide-mediated Mechanism. *J Biol Chem.* 2003;278: 2043–2050. doi:10.1074/jbc.M209715200

266. Gantner BN, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 mediates macrophage recognition of *Candida albicans* yeast but not filaments. *EMBO J*. 2005;24: 1277–1286. doi:10.1038/sj.emboj.7600594
267. Steele C, Marrero L, Swain S, Harmsen AG, Zheng M, Brown GD, et al. Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med*. 2003;198: 1677–1688. doi:10.1084/jem.20030932
268. Viriyakosol S, Fierer J, Brown GD, Kirkland TN. Innate Immunity to the Pathogenic Fungus *Coccidioides posadasii* Is Dependent on Toll-Like Receptor 2 and Dectin-1. *Infect Immun*. 2005;73: 1553–1560. doi:10.1128/IAI.73.3.1553-1560.2005
269. Roeder A, Kirschning CJ, Rupec RA, Schaller M, Weindl G, Korting HC. Toll-like receptors as key mediators in innate antifungal immunity. *Med Mycol*. 2004;42: 485–498.
270. Pelizon AC, Kaneno R, Soares AMVC, Meira DA, Sartori A. Immunomodulatory activities associated with beta-glucan derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiol Res Acad Sci Bohemoslov*. 2005;54: 557–564.
271. Arruda C, Franco MF, Kashino SS, Nascimento FRF, Fazioli R dos A, Vaz CAC, et al. Interleukin-12 protects mice against disseminated infection caused by *Paracoccidioides brasiliensis* but enhances pulmonary inflammation. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2002;103: 185–195. doi:10.1006/clim.2002.5207
272. Sionov E, Mendlovic S, Segal E. Experimental systemic murine aspergillosis: treatment with polyene and caspofungin combination and G-CSF. *J Antimicrob Chemother*. 2005;56: 594–597. doi:10.1093/jac/dki252
273. Dennehy KM, Brown GD. The role of the beta-glucan receptor Dectin-1 in control of fungal infection. *J Leukoc Biol*. 2007;82: 253–258. doi:10.1189/jlb.1206753
274. Markova N, Kussovski V, Drandarska I, Nikolaeva S, Georgieva N, Radoucheva T. Protective activity of Lentinan in experimental tuberculosis. *Int Immunopharmacol*. 2003;3: 1557–1562. doi:10.1016/S1567-5769(03)00178-4
275. Markova N, Michailova L, Kussovski V, Jourdanova M, Radoucheva T. Intranasal application of lentinan enhances bactericidal activity of rat alveolar macrophages against *Mycobacterium tuberculosis*. *Pharm*. 2005;60: 42–48.
276. Kournikakis B, Mandeville R, Brousseau P, Ostroff G. Anthrax-protective effects of yeast beta 1,3 glucans. *MedGenMed Medscape Gen Med*. 2003;5: 1.
277. Liang J, Melican D, Cafro L, Palace G, Fisette L, Armstrong R, et al. Enhanced clearance of a multiple antibiotic resistant *Staphylococcus aureus* in rats treated with PGG-glucan is associated with increased leukocyte counts and increased neutrophil oxidative burst activity. *Int J Immunopharmacol*. 1998;20: 595–614.

278. Kernodle DS, Gates H, Kaiser AB. Prophylactic anti-infective activity of poly-[1-6]-beta-D-glucopyranosyl-[1-3]-beta-D-glucopyranose glucan in a guinea pig model of staphylococcal wound infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42: 545–549.
279. Synergism between poly-(1-6)-beta-D-glucopyranosyl-(1-3)-beta-D-glucopyranose glucan and cefazolin in prophylaxis of staphylococcal wound infection... - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 22 Mar 2016]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=kaiser+1998+synergism>
280. Kukan M, Szatmáry Z, Lutterová M, Kuba D, Vajdová K, Horecký J. Effects of sizofiran on endotoxin-enhanced cold ischemia-reperfusion injury of the rat liver. *Physiol Res Acad Sci Bohemoslov.* 2004;53: 431–437.
281. The role of beta-glucan receptors on blood and tissue leukocytes in phagocytosis and metabolic activation. - PubMed - NCBI [Internet]. [cited 23 Mar 2016]. Available: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Czop+%2C+J.+K.+\(+1986+\)+.+The+role+of+%CE%B2+-glucan+receptors+in+blood+and+tissue+leukocytes+in+phagocytosis+and+metabolic+activation+.+Pathology+and+immunopathology+research+%2C+5+%2C+286+%E2%80%93+296#](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Czop+%2C+J.+K.+(+1986+)+.+The+role+of+%CE%B2+-glucan+receptors+in+blood+and+tissue+leukocytes+in+phagocytosis+and+metabolic+activation+.+Pathology+and+immunopathology+research+%2C+5+%2C+286+%E2%80%93+296#)
282. Brown GD, Gordon S. Fungal β -Glucans and Mammalian Immunity. *Immunity.* 2003;19: 311–315. doi:10.1016/S1074-7613(03)00233-4
283. Willment JA, Marshall ASJ, Reid DM, Williams DL, Wong SYC, Gordon S, et al. The human β -glucan receptor is widely expressed and functionally equivalent to murine Dectin-1 on primary cells. *Eur J Immunol.* 2005;35: 1539–1547. doi:10.1002/eji.200425725
284. Herre J, Gordon S, Brown GD. Dectin-1 and its role in the recognition of β -glucans by macrophages. *Mol Immunol.* 2004;40: 869–876. doi:10.1016/j.molimm.2003.10.007
285. Taylor PR, Tsoni SV, Willment JA, Dennehy KM, Rosas M, Findon H, et al. Dectin-1 is required for β -glucan recognition and control of fungal infection. *Nat Immunol.* 2007;8: 31–38. doi:10.1038/ni1408
286. Ross GD. Regulation of the adhesion versus cytotoxic functions of the Mac-1/CR3/ α M β 2-integrin glycoprotein. *Crit Rev Immunol.* 2000;20: 197–222.
287. Thornton BP, Větvicka V, Pitman M, Goldman RC, Ross GD. Analysis of the sugar specificity and molecular location of the beta-glucan-binding lectin site of complement receptor type 3 (CD11b/CD18). *J Immunol Baltim Md 1950.* 1996;156: 1235–1246.
288. Diamond MS, Garcia-Aguilar J, Bickford JK, Corbi AL, Springer TA. The I domain is a major recognition site on the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18) for four distinct adhesion ligands. *J Cell Biol.* 1993;120: 1031–1043.
289. Xia Y, Větvicka V, Yan J, Hanikýrová M, Mayadas T, Ross GD. The beta-glucan-binding lectin site of mouse CR3 (CD11b/CD18) and its function in generating a primed state of the receptor that mediates cytotoxic activation in response to iC3b-opsonized target cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1999;162: 2281–2290.

290. Wright SD, Silverstein SC. Tumor-promoting phorbol esters stimulate C3b and C3b' receptor-mediated phagocytosis in cultured human monocytes. *J Exp Med.* 1982;156: 1149–1164. doi:10.1084/jem.156.4.1149
291. Li B, Allendorf DJ, Hansen R, Marroquin J, Ding C, Cramer DE, et al. Yeast beta-glucan amplifies phagocyte killing of iC3b-opsonized tumor cells via complement receptor 3-Syk-phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2006;177: 1661–1669.
292. Nakayama H, Yoshizaki F, Prinetti A, Sonnino S, Mauri L, Takamori K, et al. Lyn-coupled LacCer-enriched lipid rafts are required for CD11b/CD18-mediated neutrophil phagocytosis of nonopsonized microorganisms. *J Leukoc Biol.* 2008;83: 728–741. doi:10.1189/jlb.0707478
293. Ross GD, Cain JA, Lachmann PJ. Membrane complement receptor type three (CR3) has lectin-like properties analogous to bovine conglutinin as functions as a receptor for zymosan and rabbit erythrocytes as well as a receptor for iC3b. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1985;134: 3307–3315.
294. Vetvicka V, Thornton BP, Ross GD. Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J Clin Invest.* 1996;98: 50–61.
295. Xia Y, Borland G, Huang J, Mizukami IF, Petty HR, Todd RF, et al. Function of the Lectin Domain of Mac-1/Complement Receptor Type 3 (CD11b/CD18) in Regulating Neutrophil Adhesion. *J Immunol.* 2002;169: 6417–6426. doi:10.4049/jimmunol.169.11.6417
296. Tsikitis VL, Morin NA, Harrington EO, Albina JE, Reichner JS. The lectin-like domain of complement receptor 3 protects endothelial barrier function from activated neutrophils. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2004;173: 1284–1291.
297. Brown GD, Taylor PR, Reid DM, Willment JA, Williams DL, Martinez-Pomares L, et al. Dectin-1 Is A Major β -Glucan Receptor On Macrophages. *J Exp Med.* 2002;196: 407–412. doi:10.1084/jem.20020470
298. Li B, Cramer D, Wagner S, Hansen R, King C, Kakar S, et al. Yeast glucan particles activate murine resident macrophages to secrete proinflammatory cytokines via MyD88- and Syk kinase-dependent pathways. *Clin Immunol Orlando Fla.* 2007;124: 170–181. doi:10.1016/j.clim.2007.05.002
299. Jimenez-Lucho V, Ginsburg V, Krivan HC. *Cryptococcus neoformans*, *Candida albicans*, and other fungi bind specifically to the glycosphingolipid lactosylceramide (Gal beta 1-4Glc beta 1-1Cer), a possible adhesion receptor for yeasts. *Infect Immun.* 1990;58: 2085–2090.
300. Zimmerman JW, Lindermuth J, Fish PA, Palace GP, Stevenson TT, DeMong DE. A novel carbohydrate-glycosphingolipid interaction between a beta-(1-3)-glucan immunomodulator, PGG-glucan, and lactosylceramide of human leukocytes. *J Biol Chem.* 1998;273: 22014–22020.

301. Evans SE, Hahn PY, McCann F, Kottom TJ, Pavlovic' ZV, Limper AH. Pneumocystis cell wall beta-glucans stimulate alveolar epithelial cell chemokine generation through nuclear factor-kappaB-dependent mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005;32: 490–497. doi:10.1165/rcmb.2004-0300OC
302. Wakshull E, Brunke-Reese D, Lindermuth J, Fiset L, Nathans RS, Crowley JJ, et al. PGG-glucan, a soluble beta-(1,3)-glucan, enhances the oxidative burst response, microbicidal activity, and activates an NF-kappa B-like factor in human PMN: evidence for a glycosphingolipid beta-(1,3)-glucan receptor. *Immunopharmacology.* 1999;41: 89–107.
303. Iwabuchi K, Nagaoka I. Lactosylceramide-enriched glycosphingolipid signaling domain mediates superoxide generation from human neutrophils. *Blood.* 2002;100: 1454–1464.
304. Assanasen C, Mineo C, Seetharam D, Yuhanna IS, Marcel YL, Connelly MA, et al. Cholesterol binding, efflux, and a PDZ-interacting domain of scavenger receptor-BI mediate HDL-initiated signaling. *J Clin Invest.* 2005;115: 969–977. doi:10.1172/JCI23858
305. Józefowski S, Yang Z, Marcinkiewicz J, Kobzik L. Scavenger receptors and β -glucan receptors participate in the recognition of yeasts by murine macrophages. *Inflamm Res.* 2011;61: 113–126. doi:10.1007/s00011-011-0395-5
306. Means TK, Mylonakis E, Tampakakis E, Colvin RA, Seung E, Puckett L, et al. Evolutionarily conserved recognition and innate immunity to fungal pathogens by the scavenger receptors SCARF1 and CD36. *J Exp Med.* 2009;206: 637–653. doi:10.1084/jem.20082109
307. Tao H, Yancey PG, Babaev VR, Blakemore JL, Zhang Y, Ding L, et al. Macrophage SR-BI mediates efferocytosis via Src/PI3K/Rac1 signaling and reduces atherosclerotic lesion necrosis. *J Lipid Res.* 2015;56: 1449–1460. doi:10.1194/jlr.M056689
308. Vera J, Fenutría R, Cañadas O, Figueras M, Mota R, Sarrias M-R, et al. The CD5 ectodomain interacts with conserved fungal cell wall components and protects from zymosan-induced septic shock-like syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106: 1506–1511. doi:10.1073/pnas.0805846106
309. Goodridge HS, Wolf AJ, Underhill DM. Beta-glucan recognition by the innate immune system. *Immunol Rev.* 2009;230: 38–50. doi:10.1111/j.1600-065X.2009.00793.x
310. Ariizumi K, Shen GL, Shikano S, Xu S, Ritter R, Kumamoto T, et al. Identification of a novel, dendritic cell-associated molecule, dectin-1, by subtractive cDNA cloning. *J Biol Chem.* 2000;275: 20157–20167. doi:10.1074/jbc.M909512199
311. Brown GD, Gordon S. Immune recognition: A new receptor for β -glucans. *Nature.* 2001;413: 36–37. doi:10.1038/35092620
312. Drummond RA, Brown GD. The role of Dectin-1 in the host defence against fungal infections. *Curr Opin Microbiol.* 2011;14: 392–399. doi:10.1016/j.mib.2011.07.001

313. Osorio F, Reis e Sousa C. Myeloid C-type Lectin Receptors in Pathogen Recognition and Host Defense. *Immunity*. 2011;34: 651–664. doi:10.1016/j.immuni.2011.05.001
314. Adachi Y, Ishii T, Ikeda Y, Hoshino A, Tamura H, Aketagawa J, et al. Characterization of beta-glucan recognition site on C-type lectin, dectin 1. *Infect Immun*. 2004;72: 4159–4171. doi:10.1128/IAI.72.7.4159-4171.2004
315. Heinsbroek SEM, Taylor PR, Rosas M, Willment JA, Williams DL, Gordon S, et al. Expression of Functionally Different Dectin-1 Isoforms by Murine Macrophages. *J Immunol*. 2006;176: 5513–5518. doi:10.4049/jimmunol.176.9.5513
316. del Pilar Jiménez-A M, Viriyakosol S, Walls L, Datta SK, Kirkland T, Heinsbroek SEM, et al. Susceptibility to *Coccidioides* species in C57BL/6 mice is associated with expression of a truncated splice variant of Dectin-1 (Clec7a). *Genes Immun*. 2008;9: 338–348. doi:10.1038/gene.2008.23
317. Willment JA, Gordon S, Brown GD. Characterization of the human beta -glucan receptor and its alternatively spliced isoforms. *J Biol Chem*. 2001;276: 43818–43823. doi:10.1074/jbc.M107715200
318. Taylor PR, Brown GD, Reid DM, Willment JA, Martinez-Pomares L, Gordon S, et al. The β -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. doi:10.4049/jimmunol.169.7.3876
319. Martin B, Hirota K, Cua DJ, Stockinger B, Veldhoen M. Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals. *Immunity*. 2009;31: 321–330. doi:10.1016/j.immuni.2009.06.020
320. Olynych TJ, Jakeman DL, Marshall JS. Fungal zymosan induces leukotriene production by human mast cells through a dectin-1–dependent mechanism. *J Allergy Clin Immunol*. 2006;118: 837–843. doi:10.1016/j.jaci.2006.06.008
321. Reid DM, Montoya M, Taylor PR, Borrow P, Gordon S, Brown GD, et al. Expression of the β -glucan receptor, Dectin-1, on murine leukocytes in situ correlates with its function in pathogen recognition and reveals potential roles in leukocyte interactions. *J Leukoc Biol*. 2004;76: 86–94. doi:10.1189/jlb.0104031
322. Willment JA, Lin H-H, Reid DM, Taylor PR, Williams DL, Wong SYC, et al. 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. doi:10.4049/jimmunol.171.9.4569
323. Ozment-Skelton TR, Goldman MP, Gordon S, Brown GD, Williams DL. Prolonged Reduction of Leukocyte Membrane-Associated Dectin-1 Levels following β -Glucan Administration. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006;318: 540–546. doi:10.1124/jpet.106.102293

324. Serezani CH, Kane S, Collins L, Morato-Marques M, Osterholzer JJ, Peters-Golden M. Macrophage dectin-1 expression is controlled by leukotriene B4 via a GM-CSF/PU.1 axis. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012;189: 906–915. doi:10.4049/jimmunol.1200257
325. Lee H-M, Yuk J-M, Shin D-M, Jo E-K. Dectin-1 is inducible and plays an essential role for mycobacteria-induced innate immune responses in airway epithelial cells. *J Clin Immunol*. 2009;29: 795–805. doi:10.1007/s10875-009-9319-3
326. Galès A, Conduché A, Bernad J, Lefevre L, Olagnier D, Béraud M, et al. PPAR γ controls Dectin-1 expression required for host antifungal defense against *Candida albicans*. *PLoS Pathog*. 2010;6: e1000714. doi:10.1371/journal.ppat.1000714
327. Goodridge HS, Shimada T, Wolf AJ, Hsu Y-MS, Becker CA, Lin X, et al. Differential Use of CARD9 by Dectin-1 in Macrophages and Dendritic Cells. *J Immunol*. 2009;182: 1146–1154. doi:10.4049/jimmunol.182.2.1146
328. Rosas M, Liddiard K, Kimberg M, Faro-Trindade I, McDonald JU, Williams DL, et al. The Induction of Inflammation by Dectin-1 In Vivo Is Dependent on Myeloid Cell Programming and the Progression of Phagocytosis. *J Immunol*. 2008;181: 3549–3557. doi:10.4049/jimmunol.181.5.3549
329. Goodridge HS, Reyes CN, Becker CA, Katsumoto TR, Ma J, Wolf AJ, et al. Activation of the innate immune receptor Dectin-1 upon formation of a “phagocytic synapse.” *Nature*. 2011;472: 471–475. doi:10.1038/nature10071
330. Xu S, Huo J, Gunawan M, Su I-H, Lam K-P. Activated dectin-1 localizes to lipid raft microdomains for signaling and activation of phagocytosis and cytokine production in dendritic cells. *J Biol Chem*. 2009;284: 22005–22011. doi:10.1074/jbc.M109.009076
331. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van der Vlist M, Wevers B, Bruijns SCM, et al. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF- κ B activation through Raf-1 and Syk. *Nat Immunol*. 2009;10: 203–213. doi:10.1038/ni.1692
332. Hernanz-Falcón P, Joffre O, Williams DL, Reis e Sousa C. Internalization of Dectin-1 terminates induction of inflammatory responses. *Eur J Immunol*. 2009;39: 507–513. doi:10.1002/eji.200838687
333. Xu S, Huo J, Lee K-G, Kurosaki T, Lam K-P. Phospholipase Cy2 Is Critical for Dectin-1-mediated Ca²⁺ Flux and Cytokine Production in Dendritic Cells. *J Biol Chem*. 2009;284: 7038–7046. doi:10.1074/jbc.M806650200
334. Saijo S, Iwakura Y. Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int Immunol*. 2011;23: 467–472. doi:10.1093/intimm/dxr046
335. Greenblatt MB, Aliprantis A, Hu B, Glimcher LH. Calcineurin regulates innate antifungal immunity in neutrophils. *J Exp Med*. 2010;207: 923–931. doi:10.1084/jem.20092531
336. Goodridge HS, Simmons RM, Underhill DM. Dectin-1 stimulation by *Candida albicans* yeast or zymosan triggers NFAT activation in macrophages and dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007;178: 3107–3115.

337. Tassi I, Cella M, Castro I, Gilfillan S, Khan WN, Colonna M. Requirement of phospholipase C- γ 2 (PLC γ 2) for Dectin-1-induced antigen presentation and induction of TH1/TH17 polarization. *Eur J Immunol.* 2009;39: 1369–1378. doi:10.1002/eji.200839313
338. Slack EC, Robinson MJ, Hernanz-Falcón P, Brown GD, Williams DL, Schweighoffer E, et al. Syk-dependent ERK activation regulates IL-2 and IL-10 production by DC stimulated with zymosan. *Eur J Immunol.* 2007;37: 1600–1612. doi:10.1002/eji.200636830
339. Shah VB, Ozment-Skelton TR, Williams DL, Keshvara L. Vav1 and PI3K are required for phagocytosis of beta-glucan and subsequent superoxide generation by microglia. *Mol Immunol.* 2009;46: 1845–1853. doi:10.1016/j.molimm.2009.01.014
340. Bonizzi G, Karin M. The two NF- κ B activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004;25: 280–288. doi:10.1016/j.it.2004.03.008
341. Underhill DM, Rossnagle E, Lowell CA, Simmons RM. Dectin-1 activates Syk tyrosine kinase in a dynamic subset of macrophages for reactive oxygen production. *Blood.* 2005;106: 2543–2550. doi:10.1182/blood-2005-03-1239
342. Batbayar S, Lee DH, Kim HW. Immunomodulation of Fungal β -Glucan in Host Defense Signaling by Dectin-1. *Biomol Ther.* 2012;20: 433–445. doi:10.4062/biomolther.2012.20.5.433
343. Gross O, Poeck H, Bscheider M, Dostert C, Hanneschläger N, Endres S, et al. Syk kinase signalling couples to the Nlrp3 inflammasome for anti-fungal host defence. *Nature.* 2009;459: 433–436. doi:10.1038/nature07965
344. Kankkunen P, Teirilä L, Rintahaka J, Alenius H, Wolff H, Matikainen S. (1,3)-beta-glucans activate both dectin-1 and NLRP3 inflammasome in human macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2010;184: 6335–6342. doi:10.4049/jimmunol.0903019
345. Guarda G, Braun M, Staehli F, Tardivel A, Mattmann C, Förster I, et al. Type I interferon inhibits interleukin-1 production and inflammasome activation. *Immunity.* 2011;34: 213–223. doi:10.1016/j.immuni.2011.02.006
346. Dennehy KM, Willment JA, Williams DL, Brown GD. Reciprocal regulation of IL-23 and IL-12 following co-activation of Dectin-1 and TLR signaling pathways. *Eur J Immunol.* 2009;39: 1379–1386. doi:10.1002/eji.200838543
347. Hohl TM, Rivera A, Pamer EG. Immunity to fungi. *Curr Opin Immunol.* 2006;18: 465–472. doi:10.1016/j.coi.2006.05.003
348. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2004;4: 11–24. doi:10.1038/nri1255
349. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, Lanzavecchia A, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol.* 2007;8: 639–646. doi:10.1038/ni1467

350. Huang W, Na L, Fidel PL, Schwarzenberger P. Requirement of Interleukin-17A for Systemic Anti-Candida albicans Host Defense in Mice. *J Infect Dis.* 2004;190: 624–631. doi:10.1086/422329
351. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, et al. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med.* 2009;206: 299–311. doi:10.1084/jem.20081463
352. Rogers NC, Slack EC, Edwards AD, Nolte MA, Schulz O, Schweighoffer E, et al. Syk-Dependent Cytokine Induction by Dectin-1 Reveals a Novel Pattern Recognition Pathway for C Type Lectins. *Immunity.* 2005;22: 507–517. doi:10.1016/j.immuni.2005.03.004
353. Herre J, Marshall ASJ, Caron E, Edwards AD, Williams DL, Schweighoffer E, et al. Dectin-1 uses novel mechanisms for yeast phagocytosis in macrophages. *Blood.* 2004;104: 4038–4045. doi:10.1182/blood-2004-03-1140
354. Mueller A, Raptis J, Rice PJ, Kalbfleisch JH, Stout RD, Ensley HE, et al. The influence of glucan polymer structure and solution conformation on binding to (1-->3)-beta-D-glucan receptors in a human monocyte-like cell line. *Glycobiology.* 2000;10: 339–346.
355. Lowe E, Rice P, Ha T, Li C, Kelley J, Ensley H, et al. A (1-->3)-beta-D-linked heptasaccharide is the unit ligand for glucan pattern recognition receptors on human monocytes. *Microbes Infect Inst Pasteur.* 2001;3: 789–797.
356. Palma AS, Feizi T, Zhang Y, Stoll MS, Lawson AM, Díaz-Rodríguez E, et al. Ligands for the beta-glucan receptor, Dectin-1, assigned using “designer” microarrays of oligosaccharide probes (neoglycolipids) generated from glucan polysaccharides. *J Biol Chem.* 2006;281: 5771–5779. doi:10.1074/jbc.M511461200
357. Williams DL, Pretus HA, McNamee RB, Jones EL, Ensley HE, Browder IW, et al. Development, physicochemical characterization and preclinical efficacy evaluation of a water soluble glucan sulfate derived from *Saccharomyces cerevisiae*. *Immunopharmacology.* 1991;22: 139–155.
358. Brown GD. INNATE ANTIFUNGAL IMMUNITY: THE KEY ROLE OF PHAGOCYTES. *Annu Rev Immunol.* 2011;29: 1–21. doi:10.1146/annurev-immunol-030409-101229
359. Bellocchio S, Montagnoli C, Bozza S, Gaziano R, Rossi G, Mambula SS, et al. The Contribution of the Toll-Like/IL-1 Receptor Superfamily to Innate and Adaptive Immunity to Fungal Pathogens In Vivo. *J Immunol.* 2004;172: 3059–3069. doi:10.4049/jimmunol.172.5.3059
360. Netea MG, Ferwerda G, van der Graaf CAA, Van der Meer JWM, Kullberg BJ. Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors. *Curr Pharm Des.* 2006;12: 4195–4201.
361. LeibundGut-Landmann S, Wüthrich M, Hohl TM. Immunity to Fungi. *Curr Opin Immunol.* 2012;24: 449–458. doi:10.1016/j.coi.2012.04.007

362. Tada H, Nemoto E, Shimauchi H, Watanabe T, Mikami T, Matsumoto T, et al. Saccharomyces cerevisiae- and Candida albicans-Derived Mannan Induced Production of Tumor Necrosis Factor Alpha by Human Monocytes in a CD14- and Toll-Like Receptor 4-Dependent Manner. *Microbiol Immunol.* 2002;46: 503–512. doi:10.1111/j.1348-0421.2002.tb02727.x
363. Nakamura K, Miyazato A, Xiao G, Hatta M, Inden K, Aoyagi T, et al. Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008;180: 4067–4074.
364. Biondo C, Signorino G, Costa A, Midiri A, Gerace E, Galbo R, et al. Recognition of yeast nucleic acids triggers a host-protective type I interferon response. *Eur J Immunol.* 2011;41: 1969–1979. doi:10.1002/eji.201141490
365. Jouault T, Ibata-Ombetta S, Takeuchi O, Trinel P-A, Sacchetti P, Lefebvre P, et al. *Candida albicans* Phospholipomannan Is Sensed through Toll-Like Receptors. *J Infect Dis.* 2003;188: 165–172. doi:10.1086/375784
366. Bourgeois C, Kuchler K. Fungal pathogens—a sweet and sour treat for toll-like receptors. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2. doi:10.3389/fcimb.2012.00142
367. Sukhithasri V, Nisha N, Biswas L, Anil Kumar V, Biswas R. Innate immune recognition of microbial cell wall components and microbial strategies to evade such recognitions. *Microbiol Res.* 2013;168: 396–406. doi:10.1016/j.micres.2013.02.005
368. Cambi A, Netea MG, Mora-Montes HM, Gow NAR, Hato SV, Lowman DW, et al. Dendritic Cell Interaction with *Candida albicans* Critically Depends on N-Linked Mannan. *J Biol Chem.* 2008;283: 20590–20599. doi:10.1074/jbc.M709334200
369. Takahara K, Yashima Y, Omatsu Y, Yoshida H, Kimura Y, Kang Y-S, et al. Functional comparison of the mouse DC-SIGN, SIGNR1, SIGNR3 and Langerin, C-type lectins. *Int Immunol.* 2004;16: 819–829. doi:10.1093/intimm/dxh084
370. Taylor PR, Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Gordon S. The role of SIGNR1 and the beta-glucan receptor (dectin-1) in the nonopsonic recognition of yeast by specific macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004;172: 1157–1162.
371. Gringhuis SI, den Dunnen J, Litjens M, van Het Hof B, van Kooyk Y, Geijtenbeek TBH. C-type lectin DC-SIGN modulates Toll-like receptor signaling via Raf-1 kinase-dependent acetylation of transcription factor NF-kappaB. *Immunity.* 2007;26: 605–616. doi:10.1016/j.immuni.2007.03.012
372. Wells CA, Salvage-Jones JA, Li X, Hitchens K, Butcher S, Murray RZ, et al. The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008;180: 7404–7413.
373. Robinson MJ, Osorio F, Rosas M, Freitas RP, Schweighoffer E, Gross O, et al. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J Exp Med.* 2009;206: 2037–2051. doi:10.1084/jem.20082818

374. Sato K, Yang X, Yudate T, Chung J-S, Wu J, Luby-Phelps K, et al. Dectin-2 is a pattern recognition receptor for fungi that couples with the Fc receptor gamma chain to induce innate immune responses. *J Biol Chem.* 2006;281: 38854–38866. doi:10.1074/jbc.M606542200
375. McGreal EP, Rosas M, Brown GD, Zamze S, Wong SYC, Gordon S, et al. The carbohydrate-recognition domain of Dectin-2 is a C-type lectin with specificity for high mannose. *Glycobiology.* 2006;16: 422–430. doi:10.1093/glycob/cwj077
376. Brouwer N, Dolman KM, van Houdt M, Sta M, Roos D, Kuijpers TW. Mannose-binding lectin (MBL) facilitates opsonophagocytosis of yeasts but not of bacteria despite MBL binding. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008;180: 4124–4132.
377. Choteau L, Parny M, François N, Bertin B, Fumery M, Dubuquoy L, et al. Role of mannose-binding lectin in intestinal homeostasis and fungal elimination. *Mucosal Immunol.* 2015; doi:10.1038/mi.2015.100
378. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol.* 2011;11: 275–288. doi:10.1038/nri2939
379. Dennehy KM, Ferwerda G, Faro-Trindade I, Pyż E, Willment JA, Taylor PR, et al. Syk kinase is required for collaborative cytokine production induced through Dectin-1 and Toll-like receptors. *Eur J Immunol.* 2008;38: 500–506. doi:10.1002/eji.200737741
380. Brown GD, Herre J, Williams DL, Willment JA, Marshall ASJ, Gordon S. Dectin-1 Mediates the Biological Effects of β -Glucans. *J Exp Med.* 2003;197: 1119–1124. doi:10.1084/jem.20021890
381. Ferwerda G, Meyer-Wentrup F, Kullberg B-J, Netea MG, Adema GJ. Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages. *Cell Microbiol.* 2008;10: 2058–2066. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01188.x
382. Suram S, Brown GD, Ghosh M, Gordon S, Loper R, Taylor PR, et al. Regulation of Cytosolic Phospholipase A2 Activation and Cyclooxygenase 2 Expression in Macrophages by the β -Glucan Receptor. *J Biol Chem.* 2006;281: 5506–5514. doi:10.1074/jbc.M509824200
383. Yadav M, Schorey JS. The β -glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood.* 2006;108: 3168–3175. doi:10.1182/blood-2006-05-024406
384. Shin D-M, Yang C-S, Yuk J-M, Lee J-Y, Kim KH, Shin SJ, et al. Mycobacterium abscessus activates the macrophage innate immune response via a physical and functional interaction between TLR2 and dectin-1. *Cell Microbiol.* 2008;10: 1608–1621. doi:10.1111/j.1462-5822.2008.01151.x
385. Valera I, Fernández N, Trinidad AG, Alonso S, Brown GD, Alonso A, et al. Costimulation of dectin-1 and DC-SIGN triggers the arachidonic acid cascade in human monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2008;180: 5727–5736.

386. Takahara K, Tokieda S, Nagaoka K, Takeda T, Kimura Y, Inaba K. C-type lectin SIGNR1 enhances cellular oxidative burst response against *C. albicans* in cooperation with Dectin-1. *Eur J Immunol*. 2011;41: 1435–1444. doi:10.1002/eji.200940188
387. Takahara K, Tokieda S, Nagaoka K, Inaba K. Efficient capture of *Candida albicans* and zymosan by SIGNR1 augments TLR2-dependent TNF- α production. *Int Immunol*. 2012;24: 89–96. doi:10.1093/intimm/dxr103
388. Esteban A, Popp MW, Vyas VK, Strijbis K, Ploegh HL, Fink GR. Fungal recognition is mediated by the association of dectin-1 and galectin-3 in macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108: 14270–14275. doi:10.1073/pnas.1111415108
389. Gazi U, Rosas M, Singh S, Heinsbroek S, Haq I, Johnson S, et al. Fungal recognition enhances mannose receptor shedding through dectin-1 engagement. *J Biol Chem*. 2011;286: 7822–7829. doi:10.1074/jbc.M110.185025
390. Mantegazza AR, Barrio MM, Moutel S, Bover L, Weck M, Brossart P, et al. CD63 tetraspanin slows down cell migration and translocates to the endosomal-lysosomal-MIICs route after extracellular stimuli in human immature dendritic cells. *Blood*. 2004;104: 1183–1190. doi:10.1182/blood-2004-01-0104
391. Meyer-Wentrup F, Figdor CG, Ansems M, Brossart P, Wright MD, Adema GJ, et al. Dectin-1 interaction with tetraspanin CD37 inhibits IL-6 production. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007;178: 154–162.
392. Inoue M, Shinohara ML. Clustering of Pattern Recognition Receptors for Fungal Detection. *PLOS Pathog*. 2014;10: e1003873. doi:10.1371/journal.ppat.1003873
393. Bain JM, Louw J, Lewis LE, Okai B, Walls CA, Ballou ER, et al. *Candida albicans* Hypha Formation and Mannan Masking of β -Glucan Inhibit Macrophage Phagosome Maturation. *mBio*. 2014;5. doi:10.1128/mBio.01874-14
394. McKenzie CGJ, Koser U, Lewis LE, Bain JM, Mora-Montes HM, Barker RN, et al. Contribution of *Candida albicans* Cell Wall Components to Recognition by and Escape from Murine Macrophages. *Infect Immun*. 2010;78: 1650–1658. doi:10.1128/IAI.00001-10
395. Amanianda V, Bayry J, Bozza S, Kniemeyer O, Perruccio K, Elluru SR, et al. Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*. 2009;460: 1117–1121. doi:10.1038/nature08264
396. Zaragoza O, Rodrigues ML, De Jesus M, Frases S, Dadachova E, Casadevall A. The capsule of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Adv Appl Microbiol*. 2009;68: 133–216. doi:10.1016/S0065-2164(09)01204-0
397. Wheeler RT, Kombe D, Agarwala SD, Fink GR. Dynamic, morphotype-specific *Candida albicans* beta-glucan exposure during infection and drug treatment. *PLoS Pathog*. 2008;4: e1000227. doi:10.1371/journal.ppat.1000227

398. Hohl TM, Feldmesser M, Perlin DS, Pamer EG. Caspofungin modulates inflammatory responses to *Aspergillus fumigatus* through stage-specific effects on fungal beta-glucan exposure. *J Infect Dis.* 2008;198: 176–185. doi:10.1086/589304
399. Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell.* 1997;90: 939–949.
400. Steele C, Rapaka RR, Metz A, Pop SM, Williams DL, Gordon S, et al. The beta-glucan receptor dectin-1 recognizes specific morphologies of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog.* 2005;1: e42. doi:10.1371/journal.ppat.0010042
401. Rambach G, Dum D, Mohsenipour I, Hagleitner M, Würzner R, Lass-Flörl C, et al. Secretion of a fungal protease represents a complement evasion mechanism in cerebral aspergillosis. *Mol Immunol.* 2010;47: 1438–1449. doi:10.1016/j.molimm.2010.02.010
402. Brandhorst TT, Wüthrich M, Finkel-Jimenez B, Warner T, Klein BS. Exploiting type 3 complement receptor for TNF-alpha suppression, immune evasion, and progressive pulmonary fungal infection. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004;173: 7444–7453.
403. Filler SG, Sheppard DC. Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells. *PLoS Pathog.* 2006;2: e129. doi:10.1371/journal.ppat.0020129
404. Ina K, Kataoka T, Ando T. The Use of Lentinan for Treating Gastric Cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2013;13: 681–688. doi:10.2174/1871520611313050002
405. Werling D, Hope JC, Howard CJ, Jungi TW. Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. *Immunology.* 2004;111: 41–52. doi:10.1111/j.1365-2567.2004.01781.x
406. Willcocks S, Yamakawa Y, Stalker A, Coffey TJ, Goldammer T, Werling D. Identification and gene expression of the bovine C-type lectin Dectin-1. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006;113: 234–242. doi:10.1016/j.vetimm.2006.04.007
407. Liu M, Luo F, Ding C, Albeituni S, Hu X, Ma Y, et al. Dectin-1 Activation by a Natural Product -Glucan Converts Immunosuppressive Macrophages into an M1-like Phenotype. *J Immunol.* 2015;195: 5055–5065. doi:10.4049/jimmunol.1501158
408. Murray PJ, Allen JE, Biswas SK, Fisher EA, Gilroy DW, Goerdt S, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity.* 2014;41: 14–20. doi:10.1016/j.immuni.2014.06.008
409. Cash JL, White GE, Greaves DR. Chapter 17 Zymosan-Induced Peritonitis as a Simple Experimental System for the Study of Inflammation. In: *Enzymology B-M* in, editor. Academic Press; 2009. pp. 379–396. Available: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687909054172>
410. Davies LC, Rosas M, Jenkins SJ, Liao C-T, Scurr MJ, Brombacher F, et al. Distinct bone marrow-derived and tissue-resident macrophage lineages proliferate at key stages during inflammation. *Nat Commun.* 2013;4: 1886. doi:10.1038/ncomms2877

411. Ajuebor MN, Flower RJ, Hannon R, Christie M, Bowers K, Verity A, et al. Endogenous monocyte chemoattractant protein-1 recruits monocytes in the zymosan peritonitis model. *J Leukoc Biol.* 1998;63: 108–116.
412. Lefkowitz JB. Essential fatty acid deficiency inhibits the in vivo generation of leukotriene B4 and suppresses levels of resident and elicited leukocytes in acute inflammation. *J Immunol.* 1988;140: 228–233.
413. Fujieda Y, Manno A, Hayashi Y, Rhodes N, Guo L, Arita M, et al. Inflammation and Resolution Are Associated with Upregulation of Fatty Acid β -Oxidation in Zymosan-Induced Peritonitis. *PLOS ONE.* 2013;8: e66270. doi:10.1371/journal.pone.0066270
414. Lastrucci C, Baillif V, Behar A, Al Saati T, Dubourdeau M, Maridonneau-Parini I, et al. Molecular and cellular profiles of the resolution phase in a damage-associated molecular pattern (DAMP)-mediated peritonitis model and revelation of leukocyte persistence in peritoneal tissues. *FASEB J.* 2015;29: 1914–1929. doi:10.1096/fj.14-259341
415. Goodridge HS, Underhill DM. Fungal Recognition by TLR2 and Dectin-1. *Handb Exp Pharmacol.* 2008; 87–109. doi:10.1007/978-3-540-72167-3_5
416. Elcombe SE, Naqvi S, Van Den Bosch MWM, MacKenzie KF, Cianfanelli F, Brown GD, et al. Dectin-1 Regulates IL-10 Production via a MSK1/2 and CREB Dependent Pathway and Promotes the Induction of Regulatory Macrophage Markers. *PLoS ONE.* 2013;8: e60086. doi:10.1371/journal.pone.0060086
417. Masuda Y, Togo T, Mizuno S, Konishi M, Nanba H. Soluble β -glucan from *Grifola frondosa* induces proliferation and Dectin-1/Syk signaling in resident macrophages via the GM-CSF autocrine pathway. *J Leukoc Biol.* 2012;91: 547–556. doi:10.1189/jlb.0711386
418. Harada T, Miura NN, Adachi Y, Nakajima M, Yadomae T, Ohno N. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) Regulates Cytokine Induction by 1,3- β -D-Glucan SCG in DBA/2 Mice In Vitro. *J Interferon Cytokine Res.* 2004;24: 478–489. doi:10.1089/1079990041689656
419. Sorgi CA, Rose S, Court N, Carlos D, Paula-Silva FWG, Assis PA, et al. GM-CSF Priming Drives Bone Marrow-Derived Macrophages to a Pro-Inflammatory Pattern and Downmodulates PGE2 in Response to TLR2 Ligands. *PLoS ONE.* 2012;7. doi:10.1371/journal.pone.0040523
420. Däbritz J, Weinhage T, Varga G, Wirth T, Walscheid K, Brockhausen A, et al. Reprogramming of Monocytes by GM-CSF Contributes to Regulatory Immune Functions during Intestinal Inflammation. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2015;194: 2424–2438. doi:10.4049/jimmunol.1401482
421. Min L, Isa SABM, Fam WN, Sze SK, Beretta O, Mortellaro A, et al. Synergism between Curdlan and GM-CSF Confers a Strong Inflammatory Signature to Dendritic Cells. *J Immunol.* 2012;188: 1789–1798. doi:10.4049/jimmunol.1101755
422. Stier H, Ebbeskotte V, Gruenwald J. Immune-modulatory effects of dietary Yeast Beta-1,3/1,6-D-glucan. *Nutr J.* 2014;13: 38. doi:10.1186/1475-2891-13-38

423. Williams DDL, Mueller A, Browder W. Glucan-Based Macrophage Stimulators. *Clin Immunother.* 2012;5: 392–399. doi:10.1007/BF03259335
424. de Felipe Júnior J, da Rocha e Silva Júnior M, Maciel FM, Soares A de M, Mendes NF. Infection prevention in patients with severe multiple trauma with the immunomodulator beta 1-3 polyglucose (glucan). *Surg Gynecol Obstet.* 1993;177: 383–388.
425. Rice PJ, Adams EL, Ozment-Skelton T, Gonzalez AJ, Goldman MP, Lockhart BE, et al. Oral Delivery and Gastrointestinal Absorption of Soluble Glucans Stimulate Increased Resistance to Infectious Challenge. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;314: 1079–1086. doi:10.1124/jpet.105.085415
426. Suzuki I, Tanaka H, Kinoshita A, Oikawa S, Osawa M, Yadomae T. Effect of orally administered beta-glucan on macrophage function in mice. *Int J Immunopharmacol.* 1990;12: 675–684.
427. Wójcik R. Effect of Biolex Beta-HP on phagocytic activity and oxidative metabolism of peripheral blood granulocytes and monocytes in rats intoxicated by cyclophosphamide. *Pol J Vet Sci.* 2010;13: 181–188.
428. Seegers H, Fourichon C, Beaudeau F. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet Res.* 2003;34: 475–491. doi:10.1051/vetres:2003027
429. Thrune M, Bach A, Ruiz-Moreno M, Stern MD, Linn JG. Effects of *Saccharomyces cerevisiae* on ruminal pH and microbial fermentation in dairy cows. *Livest Sci.* 2009;124: 261–265. doi:10.1016/j.livsci.2009.02.007
430. Tripathi MK, Karim SA. Effect of yeast cultures supplementation on live weight change, rumen fermentation, ciliate protozoa population, microbial hydrolytic enzymes status and slaughtering performance of growing lamb. *Livest Sci.* 2011;135: 17–25. doi:10.1016/j.livsci.2010.06.007
431. Finck DN, Ribeiro FRB, Burdick NC, Parr SL, Carroll JA, Young TR, et al. Yeast supplementation alters the performance and health status of receiving cattle. *Prof Anim Sci.* 2014;30: 333–341. doi:10.15232/S1080-7446(15)30125-X
432. Wohlt JE, Corcione TT, Zajac PK. Effect of yeast on feed intake and performance of cows fed diets based on corn silage during early lactation. *J Dairy Sci.* 1998;81: 1345–1352. doi:10.3168/jds.S0022-0302(98)75697-8
433. Broadway PR, Carroll JA, Sanchez NCB. Live Yeast and Yeast Cell Wall Supplements Enhance Immune Function and Performance in Food-Producing Livestock: A Review †,‡. *Microorganisms.* 2015;3: 417–427. doi:10.3390/microorganisms3030417
434. Ganner A, Schatzmayr G. Capability of yeast derivatives to adhere enteropathogenic bacteria and to modulate cells of the innate immune system. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2012;95: 289–297. doi:10.1007/s00253-012-4140-y
435. Zopf D, Roth S. Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet Lond Engl.* 1996;347: 1017–1021.

436. Shoaf-Sweeney KD, Hutkins RW. Adherence, anti-adherence, and oligosaccharides preventing pathogens from sticking to the host. *Adv Food Nutr Res.* 2009;55: 101–161. doi:10.1016/S1043-4526(08)00402-6
437. Roto SM, Rubinelli PM, Ricke SC. An Introduction to the Avian Gut Microbiota and the Effects of Yeast-Based Prebiotic-Type Compounds as Potential Feed Additives. *Front Vet Sci.* 2015;2. doi:10.3389/fvets.2015.00028
438. Kogan G, Kocher A. Role of yeast cell wall polysaccharides in pig nutrition and health protection. *Livest Sci.* 2007;109: 161–165. doi:10.1016/j.livsci.2007.01.134
439. Volman JJ, Ramakers JD, Plat J. Dietary modulation of immune function by β -glucans. *Physiol Behav.* 2008;94: 276–284. doi:10.1016/j.physbeh.2007.11.045
440. Ryan MT, Collins CB, O'Doherty JV, Sweeney T. Effects of dietary β -glucans supplementation on cytokine expression in porcine liver. *J Anim Sci.* 2012;90 Suppl 4: 40–42. doi:10.2527/jas.53763
441. Li J, Li DF, Xing JJ, Cheng ZB, Lai CH. Effects of beta-glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *J Anim Sci.* 2006;84: 2374–2381. doi:10.2527/jas.2004-541
442. Vetvicka V, Oliveira C. $\beta(1-3)(1-6)$ -D-glucans modulate immune status in pigs: potential importance for efficiency of commercial farming. *Ann Transl Med.* 2014;2. doi:10.3978/j.issn.2305-5839.2014.01.04
443. Sanchez NCB, Young TR, Carroll JA, Corley JR, Rathmann RJ, Johnson BJ. Yeast cell wall supplementation alters the metabolic responses of crossbred heifers to an endotoxin challenge. *Innate Immun.* 2014;20: 104–112. doi:10.1177/1753425913482152
444. Chen K-L, Weng B-C, Chang M-T, Liao Y-H, Chen T-T, Chu C. Direct enhancement of the phagocytic and bactericidal capability of abdominal macrophage of chicks by beta-1,3-1,6-glucan. *Poult Sci.* 2008;87: 2242–2249. doi:10.3382/ps.2008-00147
445. Miest JJ, Arndt C, Adamek M, Steinhagen D, Reusch TBH. Dietary β -glucan (MacroGard®) enhances survival of first feeding turbot (*Scophthalmus maximus*) larvae by altering immunity, metabolism and microbiota. *Fish Shellfish Immunol.* 2016;48: 94–104. doi:10.1016/j.fsi.2015.11.013
446. Vetvicka V, Vannucci L, Sima P. The Effects of β – Glucan on Fish Immunity. *North Am J Med Sci.* 2013;5: 580–588. doi:10.4103/1947-2714.120792
447. Sandvik A, Wang YY, Morton HC, Aasen AO, Wang JE, Johansen F-E. Oral and systemic administration of beta-glucan protects against lipopolysaccharide-induced shock and organ injury in rats. *Clin Exp Immunol.* 2007;148: 168–177. doi:10.1111/j.1365-2249.2006.03320.x
448. Gersuk GM, Razai LW, Marr KA. Methods of in vitro macrophage maturation confer variable inflammatory responses in association with altered expression of cell surface dectin-1. *J Immunol Methods.* 2008;329: 157–166. doi:10.1016/j.jim.2007.10.003

449. Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Wang JP, Specht CA, Levitz SM. Distinct Patterns of Dendritic Cell Cytokine Release Stimulated by Fungal β -Glucans and Toll-Like Receptor Agonists. *Infect Immun*. 2009;77: 1774–1781. doi:10.1128/IAI.00086-09
450. Khan NS, Kasperkovitz PV, Timmons AK, Mansour MK, Tam JM, Seward MW, et al. Dectin-1 Controls TLR9 Trafficking to Phagosomes Containing β -1,3 Glucan. *J Immunol*. 2016; 1401545. doi:10.4049/jimmunol.1401545
451. Ifrim DC, Joosten LAB, Kullberg B-J, Jacobs L, Jansen T, Williams DL, et al. *Candida albicans* primes TLR cytokine responses through a Dectin-1/Raf-1-mediated pathway. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2013;190: 4129–4135. doi:10.4049/jimmunol.1202611
452. Biswas SK, Lopez-Collazo E. Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol*. 2009;30: 475–487. doi:10.1016/j.it.2009.07.009
453. Fan H, Cook JA. Molecular mechanisms of endotoxin tolerance. *J Endotoxin Res*. 2004;10: 71–84. doi:10.1179/096805104225003997
454. Pena OM, Pistolic J, Raj D, Fjell CD, Hancock REW. Endotoxin tolerance represents a distinctive state of alternative polarization (M2) in human mononuclear cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011;186: 7243–7254. doi:10.4049/jimmunol.1001952
455. Johannessen M, Møller S, Hansen T, Moens U, Ghelue MV. The multifunctional roles of the four-and-a-half-LIM only protein FHL2. *Cell Mol Life Sci CMLS*. 2006;63: 268–284. doi:10.1007/s00018-005-5438-z
456. Huang H, Ostroff GR, Lee CK, Agarwal S, Ram S, Rice PA, et al. Relative contributions of dectin-1 and complement to immune responses to particulate β -glucans. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012;189: 312–317. doi:10.4049/jimmunol.1200603
457. Adib-Conquy M, Cavaillon J-M. Gamma Interferon and Granulocyte/Monocyte Colony-stimulating Factor Prevent Endotoxin Tolerance in Human Monocytes by Promoting Interleukin-1 Receptor-associated Kinase Expression and Its Association to MyD88 and Not by Modulating TLR4 Expression. *J Biol Chem*. 2002;277: 27927–27934.
458. Cheng S-C, Quintin J, Cramer RA, Shepardson KM, Saeed S, Kumar V, et al. mTOR- and HIF-1 α -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*. 2014;345: 1250684. doi:10.1126/science.1250684
459. Saeed S, Quintin J, Kerstens HHD, Rao NA, Aghajani-refah A, Matarese F, et al. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*. 2014;345: 1251086. doi:10.1126/science.1251086
460. Ifrim DC, Quintin J, Joosten LAB, Jacobs C, Jansen T, Jacobs L, et al. Trained immunity or tolerance: opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors. *Clin Vaccine Immunol CVI*. 2014;21: 534–545. doi:10.1128/CVI.00688-13

Immuno-modulatory effects of yeast cell wall compounds on murine macrophages and their stakes in bacterial infections of mammary gland

β -glucans (BG) are the most abundant polysaccharides of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. For decades, they have been extensively used because of their immuno-modulatory properties and their potential therapeutic effects. The aim of this study was to characterize the immune response induced by BG and to understand their mechanisms of action on murine macrophages occurring upon bacterial infections. We demonstrated that (i) BG-enriched extracts trigger low amounts of cytokine production in contrast with crude products, (ii) the immune response mediated by crude extracts results from TLRs and not from Dectin-1 signaling and (iii) BG-enriched compounds stimulate the late and strong induction of GM-CSF in a Dectin-1-dependent manner. Upon bacteria exposure, BG-enriched extracts confer a strong inflammatory to pretreated macrophages leading to synergistic increase of cytokine release, ROS production and better clearance of pathogens.

Altogether, our findings emphasize the relevancy of using BG-enriched extracts for the design of novel adjuvant formulations contributing to individuals' resistance to infections.

AUTEUR: Sarah WALACHOWSKI

TITRE : Etude des propriétés immunostimulantes de composés pariétaux de levure sur les macrophages murins et évaluation dans des modèles infectieux.

DIRECTEUR DE THESE : Gilles FOUCRAS

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : ENV Toulouse, 17 Juin 2016

RESUME (10 lignes, 120 mots)

Les β -glucanes (BG) sont les polysaccharides les plus abondants de la paroi de *Saccharomyces cerevisiae*. Depuis des millénaires, ils sont utilisés pour leurs propriétés immunostimulantes et leurs potentiels thérapeutiques. L'objectif de ce travail était de caractériser la réponse immunitaire induite par les BG et de comprendre leurs modes d'action sur les macrophages murins en contexte infectieux. Nous avons montré que (i) les extraits de paroi enrichis en BG n'induisent qu'une faible production de cytokines par les macrophages contrairement aux extraits bruts, (ii) la réponse inflammatoire médiée par les extraits bruts résulte de la signalisation des TLRs et non de Dectin-1 et (iii) les BG stimulent la synthèse tardive de GM-CSF via Dectin-1. En conditions infectieuses, les BG enrichis confèrent une forte signature inflammatoire aux macrophages prétraités conduisant à l'amplification de la production cytokinique, à la synthèse de ROS et l'optimisation de la clairance bactérienne.

En conclusion, cette étude souligne les enjeux de l'utilisation des BG enrichis comme adjuvants dans l'amélioration de la résistance des individus aux infections.

MOTS-CLES :

Macrophages, Paroi de *Saccharomyces cerevisiae*, β -glucanes, Dectin-1, Coopération des PRRs, Réponse inflammatoire, Synergie, Trained immunity.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE :

Immunologie et Maladies infectieuses

INTITULE ET ADRESSE DE L'U.F.R. OU DU LABORATOIRE

ENV-T-INRA UMR1225 IHAP- Laboratoire Interactions Hôtes-Agents Pathogènes