



HAL
open science

Etude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie

Jean-Baptiste Méar

► **To cite this version:**

Jean-Baptiste Méar. Etude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2014. Français. NNT : 2014LIL2S013 . tel-01084801

HAL Id: tel-01084801

<https://theses.hal.science/tel-01084801>

Submitted on 20 Nov 2014

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

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

UNIVERSITE LILLE NORD DE FRANCE
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE SANTÉ DE LILLE

THÈSE D'UNIVERSITÉ

Discipline : Maladies infectieuses

Présentée publiquement par Jean-Baptiste MÉAR

Le 03 Février 2014

**Étude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas*
aeruginosa par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie**

Membres du Jury

Président:	Pr Françoise VAN BAMBEKE
Rapporteurs:	Pr Muriel CORNET Pr Bertrand TOUSSAINT
Examineur:	Dr Philippe GOSSET
Directeurs de thèse:	Pr Benoit GUERY Dr Eric KIPNIS

A Cécile
A mes Parents

- REMERCIEMENTS -

Je remercie le Pr Benoît Guery, dit “le méchant” de m’avoir accepté dans son équipe et de m’avoir fait confiance. Merci pour toutes les opportunités que tu m’as données et qui m’ont permis de rencontrer plein de gens formidables et de voyager dans le monde entier ! Merci pour ton encadrement libre, qui permet de garder le cap sans fermer les portes aux découvertes faites “en passant”.

Je remercie le Pr Karine Faure de m’avoir convaincu de faire la thèse “pour continuer à m’amuser”, pour ses remarques pertinentes, son soutien inconditionnel dans les situations difficiles et sa diplomatie !

Je remercie le Dr Eric Kipnis pour avoir co-encadré ma thèse avec Benoît. Merci pour toutes les séances de travail pour les dead line de dernière minute, les idées lancées comme ça toujours pertinentes et le soutien moral les jours de blues. Merci d’avoir été le meilleur chasseur de resto des 3 dernières années, et de nous avoir toujours déniché la petite gargote qui va bien où que tu sois !

Merci à vous trois de m’avoir montré qu’on pouvait être PU-PH et être humain, être doué sans se la raconter et que la médecine n’empêchait pas de faire du surf ou de la guitare électrique !

Merci au Pr Renaud Verdon de m’avoir orienté vers l’équipe de Benoît, pour m’avoir fait confiance, m’avoir soutenu et épaulé pendant ces 3 années.

Merci au Dr Philippe Gosset de m’avoir encadré pour toutes les manip concernant la cytométrie en flux. Merci pour votre rigueur scientifique, votre disponibilité et votre générosité. Merci pour votre phlegme Anglais légendaire et pour le vélo qui m’a permis de rester fidèle à ma réputation pendant les six derniers mois de thèse.

Merci au Dr Hélène Tiesset, pour avoir été mon initiatrice à la recherche et m’avoir appris à manipuler, des souris à la bactério. Merci de nous avoir, Cécile et moi, accueilli dans le labo et encadrés tout au long de notre master II !

Merci au Dr Cécile Rouyer, ma co-interne de Master II de Marseille à Lille, aux côtés de qui j'ai découvert la vie de labo, l'entraide, la satisfaction des expériences réussies et le désespoir des manips qui ratent !

Merci au Dr Rodrigue Dessenin pour sa bonne humeur, sa verve flamboyante et pour son sac rose. Merci aussi pour les idées à foison et les manips de qPCR qui ont -enfin- été reproductibles !

Merci au Dr Fanny Vuotto : c'est grâce à toi et à ta présentation au G4 que je me suis embarqué dans cette aventure. Merci pour ta bonne humeur et tes critiques constructives.

Merci au Dr Anne Prevotat pour ses conseils avisés, pour m'avoir remonté le moral quand j'ai débarqué dans le grand Nord depuis Marseille. Merci pour ton amitié "cash" et pour avoir couvert tous les menus larcins organisés dans le service !

Merci à Emmanuel Faure (Dr Faure maintenant !) et au Dr Guillaume Schurtz, les meilleurs co-thésard ever. Merci pour tous les moments partagés au cours de cette thèse : pour le fricadellome, les manips improvisées, les nuits passées devant le cytomètre ou lorsque la neige m'empêchait de retourner sur Paris... Merci de m'avoir initié à la culture ch'ti, aux bières belges, aux manips à trois et aux bière sur le toit ! Le fait de vous avoir rencontré justifie cette thèse en soi !!

Merci au Dr Muriel Pichavant, à Gaëlle Rémy, à Gwenola Kervoazé et à Eva Vilain pour leur soutien, leur bonne humeur et leur aide précieuse !

Merci à Teddy Grandjean pour m'avoir appris la qPCR, aux Dr Sylvain Normand et Aurélie Couturier, à Marion Thépaut, Anne Delanoy et Myriam Delacre pour leur bonne humeur et pour le front uni formé dans les moments difficiles.

Merci aux membres de l'équipe 2 de l'U995, et plus particulièrement au Pr Daniel Poulain, l'un des instigateurs de mon projet, et au Dr Chantal Fradin pour leur aide et leurs conseils avisés.

Merci aux membres de l'équipe 8 du CIIL. Merci plus particulièrement à Josette Fontaine, Julien Tabareau et au Dr Christophe Carnoy pour leur bienveillance.

Merci à Thierry Chassat pour avoir été toujours arrangeant et de m'avoir permis de faire mes manips de thèse dans de bonnes conditions.

Merci à Julien Buyck, dit "le belge" et à toute l'équipe de Louvain (Ahalieyah, Eugénie) pour leur bonne humeur et les échanges d'idées (et de souches).

Merci au Dr Maya Kroubi pour avoir égayé les repas pris au labo pendant le Master II !

Merci à Fabienne Meslem, pour m'avoir fait découvrir et aimer Marseille et m'avoir initié à la cuisine Algérienne pendant 6 semaines !

Merci à l'équipe d'hémato du CHU de Caen d'avoir été compréhensive lorsque je suis revenu, après 3 ans sans toucher un patient ! A Sylvain, Anne-Claire, Marie, Quentin, Christophe et Charles pour avoir rendu agréable le retour sur Caen.

Merci également à toutes les personnes que j'ai rencontrées et qui m'ont aidées à différents niveaux : les Dr Chanez Chemani, Henry Bernard, et tous les membres du GDR.

Merci à mes parents pour m'avoir non seulement laissé faire ce que je voulais, mais pour m'avoir en plus soutenu au cours de toutes ces années !

Merci à Cécile d'avoir partagé cette aventure avec moi, entre le collègue de France, Créteil, la gare du Nord et Lille. Merci aussi pour ton soutien, pour le meilleur et pour le pire !

Merci aux Professeurs Françoise Van Bambeke, Muriel Cornet et Bertrand Toussaint pour leur soutien et leurs conseils tout au long de la thèse, et pour avoir accepté de venir juger ce travail.

Ce travail a été réalisé sous la codirection du Professeur Benoit Guery et du Docteur Eric Kipnis, au sein du Host-pathogen translational research group, Faculté de Médecine de Lille UDSL, en collaboration avec le Dr Philippe Gosset, Institut Pasteur de Lille, Centre d'Infection et d'Immunité de Lille, Université Lille Nord de France, Inserm U1019 – CNRS UMR 8204, Lille, et avec le Pr Daniel Poulain, Regulation of candida cell wall glycan-host interface, Faculté de Médecine de Lille, Université Lille Nord de France, CHRU de Lille, Inserm U995, Lille. Ce travail a donné lieu aux communications & publications suivantes :

Communications affichées :

MEAR JB., KIPNIS E., TIESSET H, JAWAHARA S, ROUYER C, VUOTTO F, POULAIN D, CHAMAILLARD M, FAURE K, GUERY BP. Lung sensitization by *Candida albicans* protects from *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury independently of Quorum Sensing. ICMI, Mai 2011, Paris.

MEAR JB., KIPNIS E., TIESSET H, JAWAHARA S, ROUYER C, VUOTTO F, POULAIN D, FAURE K, GUERY BP. Role of *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* direct interaction in the protective effect of *C. albicans* colonisation on *P. aeruginosa*-induced lung injury. ECCMID, Avril 2011, Milan.

MEAR JB., FAURE E., KIPNIS E., GOSSET P., SCHURTZ G., FAURE K, GUERY BP. Lung sensitization by *Candida albicans* protects from *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury. ICAAC, Septembre 2012, San Francisco.

Communications orales :

MEAR JB., KIPNIS E., TIESSET H, JAWAHARA S, ROUYER C, VUOTTO F, POULAIN D, FAURE K, GUERY BP. Etude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie. Rencontres Junior/Senior Myco, Annecy, Décembre 2010.

MEAR JB., KIPNIS E., TIESSET H, ROUYER C, POULAIN D, CHAMAILLARD M. FAURE K, GUERY BP, GOSSET P. Lung sensitization by *Candida albicans* protects from *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury through macrophage activation not polymorphonuclear recruitment. Inflammation, Paris, Juin 2011.

MEAR JB., FAURE E. KIPNIS E., FAURE K., DESSEIN R., SCHURTZ G., GOSSET P., GUERY BP. Lung sensitization by *Candida albicans* protects from *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury Through Expression of Antimicrobial Peptides. J2R, Lille, Octobre 2012

MEAR JB., FAURE E. KIPNIS E., FAURE K., DESSEIN R., SCHURTZ G., GOSSET P., GUERY BP. Etude de la modulation de la virulence de *Pseudomonas aeruginosa* par *Candida albicans* dans un modèle de pneumonie. GDR Pseudomonas, Autrans, Octobre 2011

Publications

MEAR JB., KIPNIS E., FAURE E., DESSEIN R., SCHURTZ G., FAURE K., GUERY BP. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* Interactions: More Than an Opportunistic Criminal Association? Med Mal Infect. 2013 Apr;43(4):146-51. doi: 10.1016/j.medmal.2013.02.005. Epub 2013 Apr 23.

MEAR JB., GOSSET P., KIPNIS E., FAURE E., DESSEIN R., JAWHARA S., FRADIN C., FAURE K., POULAIN D., SENDID B., GUERY BP. *Candida albicans* airway exposure primes the lung innate immune response against *Pseudomonas aeruginosa* infection through innate lymphoid cell recruitment and IL-22 associated mucosal response. Infect Immun. 2014 Jan;82(1):306-15. doi: 10.1128/IAI.01085-13. Epub 2013 Oct 28

FAURE E., MEAR JB., FAURE K., NORMAND S., COUTURIER-MAILLARD A., GRANDJEAN T., BALLOY V., DESSEIN R., CHIGNARD M., UYTTNEHOVE C., GUERY BP., GOSSET P., CHAMAILLARD M., KIPNIS E. “*Pseudomonas aeruginosa* Type-3 secretion system dampens host defense by exploiting NLRC4 inflammasome. ” American Journal of respiratory and critical care medicine. 1–36 (2014).

BOUKERB A., ROUSSET A., GALANOS N., MEAR JB., GILLON E., CECIONI S., ABDERRAHMEN C., FAURE K., REDELBERGER D., KIPNIS E., DESSEIN R., HAVET S., DARBLADE B., MATTHEWS S., DE BENTZMANN S., GUERY BP., COURNOYER B., IMBERTY A., VIDAL S. “Anti-adhesive properties of glycoclusters against *Pseudomonas aeruginosa* lung infection” Journal of Medicinal Chemistry (Soumis en 2014)

Travaux réalisés en collaboration au cours du travail de thèse

Test d'un inhibiteur glycosidique (GMI-1051) des lectines de *P. aeruginosa* dans un modèle murin d'infection pulmonaire chronique. Dr J. Magnani, Glycomimetics Inc., GAITHERSBURG, MD, USA

Protection de la pneumonie à *P. aeruginosa* par une souche vaccinale de *Bordetella pertussis* (Bpze1). Dr C. Locht, CIIL, Inserm U1019, Institut Pasteur de Lille, LILLE.

Test de souches de *P. aeruginosa* mutées pour les gènes impliqués dans le métabolisme des Kynurénines dans un modèle murin de pneumonie. Pr B. Toussaint, Laboratoire The Rex/TIMC-IMAG, CNRS UMR 5525, GRENOBLE.

Test de l'effet de la forskolin, du Salmeterol et du rolipram (inhibiteurs de dégradation de l'AMPc) dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa*. Dr P. Huber, UMR1036 INSERM-CEA-UJF / CNRS ERL5261, CEA, GRENOBLE.

Test d'inhibiteurs glycosidique (Kalyxarènes) des lectines de *P. aeruginosa* dans un modèle de culture cellulaire. Dr S. Vidal, Laboratoire de Chimie Organique 2 - Glycochimie UMR-CNRS 5246, Université Claude Bernard Lyon 1, LYON.

Test de l'effet d'extraits d'huiles essentielles dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa*. M^{me} E. Rossines, Aromatechnologies SAS, ROMORANTIN-LANTHENAY.

- SOMMAIRE -

INTRODUCTION.....	14
I. LA PNEUMONIE	15
I. A. Définition, symptomatologie, épidémiologie	15
I. B. Physiopathologie	15
I. C. Modèles animaux de pneumonie	17
I. C. 1. Infection des animaux	17
I. C. 2. Modèle chronique.....	18
I. C. 3. Modèles de PAVM.....	19
I. C. 4. La lésion pulmonaire	19
I. C. 5. Choix du modèle	21
II. CANDIDA ALBICANS.....	21
II. A. Caractéristiques microbiologiques	21
II. A. 1. Classification	21
II. A. 2. Morphologie.....	22
II. A. 3. Paroi	23
II. A. 4. Quorum Sensing	24
II. A. 5. Biofilm	25
II. B. Distribution, habitat	25
II. C. Virulence	25
II. D. Pathogénicité	26
II. D. 1. Candidoses muqueuses	27
II. D. 2. Candidoses invasives	28
II. E. Facteurs favorisants & Réponse de l'hôte	28
II. E. 1. Mécanismes déduits de pathologies humaines.....	29
II. E. 1. α . Candidoses muqueuses	29
II. E. 1 β . Candidoses invasives	31
II. E. 2. Modèle intégré de la réponse à <i>C. albicans</i>	31
III. PSEUDOMONAS AERUGINOSA.....	33
III. A. Caractéristiques microbiologiques.....	33
III. B. Distribution, habitat.....	34
III. C. Virulence.....	35
III. C. 1. Quorum Sensing	35
III. C. 2. Facteurs de Virulence	36
III. C. 2. α . Facteurs sécrétés.....	37
III. C. 2. β . Facteurs constitutionnels	38
III. D. Pathogénicité, facteurs favorisants	39
III. E. Réponse de l'hôte.....	39
IV. INTERACTIONS ENTRE <i>C. ALBICANS</i> & <i>P. AERUGINOSA</i>	41
MATÉRIEL & MÉTHODES.....	43
I. MODÈLE ANIMAL	43
I. A. Animaux.....	43
I. B. Souches de bactérie et de levure.....	43
I. B. 1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	43
I. B. 2. <i>Candida albicans</i>	44
I. B. 3. Autres microorganismes.....	44
I. C. Modèle murin de pneumonie	44
I. C. 1. Colonisation & infection	44
I. C. 2. Traitements pharmacologiques (cf. Tableau 2).....	45

I. C. 3. Transfert de cellules immunitaires	47
II. ÉVALUATION & RECUEIL DE RÉSULTATS DANS LE MODÈLE ANIMAL	49
II. A. Poids & survie.....	49
II. B. Quantification des lésions pulmonaires : perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire	49
II. C. Analyse bactérienne et fongique	49
II. C. 1. Charges bactérienne et fongique pulmonaires	49
II. C. 2. Translocation bactérienne et fongique	49
II. D. Caractérisation de la réponse immune.....	50
II. D. 1. Caractérisation cellulaire	50
II. D. 1. α . LBA et récupération des poumons	50
II. D. 1. β . Extraction des cellules.....	50
II. D. 1. γ . Analyse des cellules par cytométrie en flux.....	50
II. D. 2. Dosage des cytokines dans le surnageant de LBA	51
II. D. 3. Dosage des défensines par RT-qPCR	51
III. <i>IN VITRO</i>	52
III. A. Extraction des composants de la paroi de <i>C. albicans</i>	52
III. A. 1. Extraction des mannanes	52
III. A. 2. Extraction des β -glucanes.....	52
III. A. 3. Extraction de la chitine.....	53
III. B. Stimulation cellulaire <i>in vitro</i>	53
IV. ANALYSES STATISTIQUES	53
RÉSULTATS	56
I. VALIDATION DU MODÈLE DANS LE FOND C57BL/6	56
II. VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUÉES DANS LA RÉPONSE PROTECTRICE	57
III. RÉPONSE CELLULAIRE ET CYTOKINIQUE INDUITE PAR <i>C. ALBICANS</i>	58
IV. CCL20	59
V. UTILISATION DES POLYOSIDES PARIÉTAUX DE <i>C. ALBICANS</i>	60
DISCUSSION	62
CONCLUSION.....	69
BIBLIOGRAPHIE	70

- FIGURES & TABLEAUX -

Figure 1. Physiopathologie des lésions de la barrière alvéolocapillaire.....	20
Figure 2. Arbre phylogénétique de <i>C. albicans</i>	22
Figure 3 : Morphologies de <i>C. albicans</i>	22
Figure 4 : Structure de la paroi de <i>C. albicans</i>	24
Figure 5 : Molécules du QS de <i>C. albicans</i>	25
Figure 6. Filamentation: passage de la colonisation à l'infection.....	26
Figure 7 : Modèle simplifié de la réponse induite par <i>C. albicans</i> au niveau pulmonaire.....	32
Figure 8. Arbre Phylogénétique de <i>P. aeruginosa</i>	34
Figure 9. Biofilm de <i>P. aeruginosa</i>	35
Figure 10 : Quorum Sensing de <i>P. aeruginosa</i>	36
Figure 11. Facteurs de virulence de <i>P. aeruginosa</i>	36
Figure 12. Groupes expérimentaux.....	45
Figure 13. Evaluation du modèle dans les fonds génétiques BALB/c et C57BL/6.....	56
Figure 14 : Evaluation des voies de l'IL-1 β et NF κ B.....	58
Figure 15. Rôle de CCL20 dans le recrutement des ILC.....	59
Figure 16 : Evaluation de l'activité des polysides pariétaux de <i>C. albicans</i> dans la protection au cours des pneumonies.....	61
Figure 17 : Modèle de la réponse induite par <i>C. albicans</i>	65
Figure 18: Modèle de la réponse induite par <i>P. aeruginosa</i> après exposition à <i>C. albicans</i> ...	69
Tableau 1. Facteurs favorisant des candidoses.....	29
Tableau 2. Traitements administrés aux différents groupes de souris.....	48
Tableau 3. Mix d'anticorps en fonction des cellules d'intérêt.....	51
Tableau 4. Amorces utilisées pour la qPCR.....	52

- ABBREVIATIONS -

*	$p < 0,05$
**	$p < 0,01$
***	$p < 0,001$
AHR	Aryl Hydrocarbon Receptor
ALS	Agglutinin like sequence
ANOVA	One Way Analysis Of Variance
BCP	Bromo-cresol Purple agar
C12 HSL	Homo-sérine lactone à 12 atomes de carbone
C8 HSL	Homo-sérine lactone à 8 atomes de carbone
CCL20	chemokine ligand 20
CCR6	chemokine receptor 6
CFU	Unité formant colonie
CLR	C-type lectin receptor
CT	Cycle seuil
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
HSL	Homo-sérine lactone
HWP1	Hyphal Wall Protein 1
IN	Intra-Nasal
IP	Intra-péritonéal
LB	Milieu de Luria-Bertani
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LPS	LipoPolySaccharide
MOI	Multiplicity of infection
MyD88	Myeloid Differentiation primary response gene 88
NF κ B	Nuclear Factor κ B
NLR	NOD-like receptor
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
NS	Non Significatif
PAMP	Motifs moléculaires associés aux pathogènes
PAVM	Pneumopathie acquise sous ventilation mécanique
PBS	Phosphate-buffered saline
PNN	Polynucléaires neutrophiles
PQS	Pseudomonas Quinolone Signal
PRR	Récepteur de reconnaissance des motifs
QS	Quorum Sensing
SAP	Secreted Aspartyl protease
SSI	Sérum salé isotonique: NaCl 9‰
SST	Système de sécrétion de type...
SYK	Spleen tyrosine Kinase
TIRAP	Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein
TLR	Toll-like receptor
YPD	Milieu Yeast-Peptone-Dextrose

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) et *Candida albicans* (*C. albicans*) sont des pathogènes opportunistes fréquemment isolés chez des patients présentant des facteurs de risque d'infection. La résistance de *P. aeruginosa* aux antibiotiques est en croissance permanente et les rapports de cas de multi résistance voire de pan-résistance sont de plus en plus fréquents (1). L'association de ces deux microorganismes est fréquente dans les services de réanimation, notamment au niveau des voies aériennes. L'implication clinique de cette association reste indéterminée. En 2006, Azoulay et al. ont mis en évidence une association positive entre la colonisation des voies aériennes par *C. albicans* et le risque de pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) (2). Nous avons développé un modèle murin de colonisation des voies aériennes par *C. albicans* et avons testé l'effet de cette colonisation dans notre modèle de pneumonie à *P. aeruginosa*. De façon surprenante, nous avons mis en évidence que la colonisation des voies aériennes par *C. albicans* diminuait la sévérité des pneumonies à *P. aeruginosa* (3).

Des interactions directes ayant été mises en évidence de façon expérimentale entre *P. aeruginosa* et *C. albicans* (4,5), nous avons exploré ces interactions pour évaluer leur effet sur la protection induite par *C. albicans*. Mais aucune interaction directe n'a permis d'expliquer cette protection (Méar JB & Guery BP, travail de MASTER II, données non publiées). En revanche, l'exposition des voies aériennes à *C. albicans* était responsable d'un recrutement alvéolaire de macrophages. Nous avons par conséquent décidé d'explorer la réponse immunitaire induite par *C. albicans* au niveau pulmonaire afin de déterminer si elle était responsable de la protection observée.

L'objectif de ce travail était donc d'étudier la réponse immunitaire induite par *C. albicans* au niveau pulmonaire, pour comprendre les mécanismes diminuant la sévérité de la pneumonie à *P. aeruginosa*.

I. La Pneumonie

I. A. Définition, symptomatologie, épidémiologie

La pneumonie ou infection respiratoire basse est une infection des voies aériennes inférieures. Elle résulte de la multiplication d'un microorganisme (virus, bactérie ou champignon) dans un lieu habituellement exempt de pathogènes: les bronchioles et alvéoles.

Les symptômes de la pneumonie associent des signes généraux (fièvre, asthénie), une toux, souvent productive, une douleur thoracique et un essoufflement. L'examen clinique met en évidence des crépitants, témoins de l'œdème alvéolaire lésionnel et des signes en rapport avec la tolérance de la pneumonie (augmentation de la fréquence respiratoire, cyanose, voire détresse respiratoire aiguë).

La pneumonie est la quatrième cause de mortalité dans le monde et la première cause de mortalité par maladie infectieuse en Europe. Son incidence est de 1,54 à 1,7/1000habitant par an (6). Les facteurs de risque reconnus sont l'âge ≥ 65 ans, le tabagisme, l'alcoolisme, l'immunodépression et toutes maladie chronique responsable d'une dysfonction d'organe (Insuffisance rénale, cardiaque, Broncho-pneumopathie chronique obstructive...). Les pneumonies sont la deuxième cause d'infection nosocomiale en France, mais la première cause de mortalité par infection nosocomiale (chiffres R.A.I.S.I.N 2012).

Parmi les pneumonies nosocomiales, celles des patients de réanimation ou pneumopathie acquise sous ventilation mécanique (PAVM) sont celles qui ont le pronostic le moins favorable, avec une incidence d'environ 13,5% et une mortalité variable, en fonction du germe, de 30 à 60% (chiffres RÉA-R.A.I.S.I.N 2012 (7,8)). *P. aeruginosa* est le germe le plus fréquemment rencontré au cours des PAVM et celui qui est responsable de la mortalité la plus importante (8,9).

Le traitement de ces PAVM repose sur une antibiothérapie à large spectre, d'autant que les germes responsables de ces infections nosocomiales sont souvent multirésistants. Ces dernières années, le niveau de résistance de *P. aeruginosa* n'a cessé d'augmenter, avec l'apparition de souches multi- voire pan résistantes (9,10), conduisant parfois à des échecs cliniques en l'absence d'alternative thérapeutique.

I. B. Physiopathologie

De nombreux mécanismes permettent d'empêcher l'accès des micro-organismes aux voies respiratoires inférieures. La première barrière à l'infection est mécanique : l'épithélium bronchique et alvéolaire est bordé d'un mucus composé de glycoprotéines et de

polysaccharides hydratés capable de piéger les particules qui ont passé les barrières plus haut situées. Ce mucus contient également des peptides antimicrobiens et des protéines du complément capables de tuer les bactéries (11). Il est évacué jusqu'au carrefour laryngé par des cils vibratiles et dégluti. Le défaut d'un seul de ces systèmes (défaut de synthèse des glycoprotéines, défaut d'hydratation du mucus, défaut des cils), inné ou acquis est responsable d'infections bactériennes chroniques (les trois atteintes les plus connues étant la mucoviscidose, le syndrome de Kartagener et la broncho-pneumopathie chronique obstructive post tabagique).

Au niveau de l'alvéole, la barrière entre l'air et le sang est épaisse d'un μm seulement, composée d'un pneumocyte, de sa membrane basale et d'une cellule endothéliale. C'est la barrière la plus fine qui existe entre le sang et le milieu extérieur (12). Les capillaires pulmonaires localisés au contact des alvéoles vont, du fait de leur conformation, piéger les polynucléaires neutrophiles (PNN), augmentant leur concentration 50 fois par rapport au sang périphérique. Ils constituent ainsi une réserve opérationnelle, prête à intervenir (12). L'alvéole contient des macrophages, qui constituent la dernière ligne de défense avant l'épithélium alvéolaire. Si une bactérie parvient à atteindre l'espace alvéolaire, elle sera reconnue par les PRR des macrophages et phagocytée (13).

La réponse immunitaire au niveau pulmonaire est toujours partagée entre deux impératifs : éliminer le microorganisme pour éviter sa dissémination et préserver la fonction d'organe. En effet, l'œdème et l'afflux de PNN au niveau alvéolaire empêche les échanges gazeux et la pneumonie peut entraîner, lorsque la surface atteinte est trop importante, un syndrome de détresse respiratoire aiguë et le décès du patient (14). Chez l'animal, des études ont mis en évidence que la limitation de l'inflammation pouvait être bénéfique au cours des pneumonies. Ces découvertes n'ont pour l'instant pas encore été appliquées chez l'homme (12) et restent controversées.

Après l'installation de l'infection, l'un des signes de gravité est la perte du confinement du microorganisme, c'est à dire sa diffusion à travers la barrière épithéliale, la dissémination et l'invasion d'organes situés à distance.

Les pathogènes à l'origine des pneumonies ne sont pas tous responsables du même tableau. Ainsi *Streptococcus pneumoniae* ne nécessite pas un inoculum important pour déclencher une pneumonie chez l'immunocompétent. À l'inverse, *P. aeruginosa* a besoin d'un terrain favorable pour s'installer, c'est à dire un défaut mécanique (intubation, absence de toux), un défaut du milieu (stagnation ou changement des propriétés physico-chimiques du mucus) ou un déficit immunitaire (comme ceux que l'on peut rencontrer en réanimation après

un choc septique, ou sur des terrains particuliers comme le diabète, la neutropénie, le cancer...). Toutes ces conditions sont rassemblées chez les patients de réanimation, d'où la fréquence des PAVM. Dans les modèles murins, l'augmentation de l'inoculum permet de pallier à l'absence de facteur favorisant.

Les facteurs favorisant la pneumonie à *P. aeruginosa* sont également ceux qui favorisent la colonisation des voies aériennes par *C. albicans*, d'où la fréquence de leur co-isolation (2).

I. C. Modèles animaux de pneumonie

I. C. 1. Infection des animaux

L'exposition à des animaux infectés est le moyen le plus proche de la réalité pour transmettre un pathogène, et permet d'étudier à la fois la transmission et la sévérité de la pneumonie. Cependant, peu de pathogènes humains sont contagieux spontanément chez l'animal, ce qui limite cette approche. De plus, cela ne permet pas de contrôler l'inoculum et le taux d'infection. L'utilisation d'aérosol (mise en suspension du pathogène dans des gouttelettes de 4 à 6µm de diamètre) reproduit la transmission aéroportée, et permet un dépôt symétrique et uniforme du pathogène dans les voies aériennes (15). Cette procédure est simple, rapide, et permet un contrôle de l'inoculum. Cependant, elle nécessite un matériel spécifique coûteux et expose au risque de contamination de l'environnement de l'animal (yeux, bouche, fourrure) et de l'opérateur. De plus, il existe une limitation de l'inoculum, et certains pathogènes comme le pneumocoque sont très sensibles à l'aérosolisation, et ne sont pas utilisables avec cette technique.

L'injection de pathogènes dans la trachée, soit directement après exposition et ouverture chirurgicale de la trachée (voie intra-trachéale), soit après intubation orotrachéale (voie endotrachéale). Ces deux voies offrent les mêmes avantages : possibilité d'inoculer tous les pathogènes, quel que soit l'inoculum dans les voies aériennes inférieures, avec un bon contrôle de cet inoculum. Ce sont les seules voies possibles pour la délivrance de billes d'agar utilisées dans les modèles d'infection chronique. Ces techniques partagent comme inconvénients la nécessité d'une anesthésie générale et le dépôt de l'inoculum qui peut être inhomogène et asymétrique, voire sélectif. La voie intra-trachéale nécessite en plus une chirurgie (exposant à des complications spécifiques) et est une procédure longue (≈20 minutes par animal pour un opérateur entraîné). La voie endo-trachéale est difficile à mettre en œuvre techniquement et nécessite un opérateur entraîné pour des résultats reproductibles. Cette voie

expose en plus à la contamination des voies aériennes inférieures par la flore oropharyngée (16).

La voie intranasale (IN) est la plus simple de toutes. Elle nécessite une anesthésie de courte durée et ne présente pas de difficulté technique particulière. Elle permet de délivrer un inoculum important, quel que soit le type de pathogène. Elle partage avec les voies trachéales le désavantage d'une répartition inhomogène et asymétrique de l'inoculum, et expose à risque de contamination par la flore naso-pharyngée. Son inconvénient principal est la diffusion de l'inoculum aux voies aériennes supérieures. Certains auteurs lui reprochent également son manque de reproductibilité et la variabilité induite par le volume instillé et la concentration de l'inoculum (15,17). Cependant, après une mise au point et un contrôle strict de la concentration, du volume instillé, de la position de l'animal et du mode d'anesthésie, la voie intranasale apparaît être la voie la plus reproductible dans notre modèle. Cette voie nous a permis de diminuer les écarts-types et d'augmenter la reproductibilité entre les expériences. Elle nous a également permis de diminuer la mortalité per-procédure. Ces améliorations nous ont permis de diminuer le nombre de souris par groupe expérimental de dix à cinq, tout en augmentant la significativité (Méar JB., Faure E. et Guery B., données non publiées).

I. C. 2. Modèle chronique

L'une des particularités de *P. aeruginosa* est d'être capable de provoquer des pneumonies aiguës, notamment des PAVM. Mais c'est également un pathogène majeur des patients atteints de mucoviscidose (18). L'acquisition de *P. aeruginosa* se fait en général au cours de l'adolescence chez ces patients. L'évolution va se faire par poussées, avec une colonisation constante, et des exacerbations responsables d'une altération de la fonction pulmonaire (19).

Pour reproduire la colonisation des voies aériennes par *P. aeruginosa*, un modèle a été développé (20). Dans ce modèle, les bactéries sont emprisonnées dans des billes d'agar. Ces billes sont alors instillées aux animaux. La libération des bactéries va se faire lentement (4-15 jours en fonction de la viscosité de l'agar et de la taille des billes) et provoquer une inflammation subaiguë des poumons. Ce modèle est de moins en moins utilisé depuis l'apparition de souris génétiquement modifiées dont la symptomatologie s'apparente à la mucoviscidose.

Ce modèle reste tout de même intéressant pour l'étude du comportement bactérien sur une échelle de temps plus longue *in vivo* : activation des gènes de virulence, molécules d'adhésion ou importance du Quorum Sensing.

I. C. 3. Modèles de PAVM

L'un des meilleurs modèles de PAVM est le porcelet intubé. Il va développer dans les cinq jours suivant l'intubation une pneumopathie bilatérale spontanée (21). Ce modèle est le plus proche de la réalité, mais il ne permet pas de contrôler la ou les bactéries responsables de la pneumonie, ni l'inoculum. Il est surtout utile pour des études de l'effet de la ventilation ou des médicaments sur la PAVM. Les modèles murins offrent l'avantage de la maniabilité, du coût et de la proximité de leur système immunitaire avec le système immunitaire humain. De plus, il existe un grand nombre de fonds génétiques disponibles avec des inactivation géniques, et la littérature extensive publiée sur le sujet permet d'avoir une référentiel externe (15).

Il existe des modèles murins de PAVM à *P. aeruginosa*. Certains d'entre eux ont été utilisés dans le laboratoire (22), sur des rats. Dans ce modèle, les rats sont intubés, et monitorés sur le plan cardiaque par un cathéter carotidien. L'avantage de ce modèle est de reproduire sur un petit animal les conditions de pression et le matériel étranger présent sur le patient. Le désavantage principal est la durée d'évolution, dont le maximum ne peut être que de quelques heures. Cette durée d'évolution est insuffisante pour pouvoir reproduire ce qui se passe en clinique : les lésions induites par la pression positive du respirateur, la colonisation progressive des voies aériennes par des germes de la flore digestive secondaire à l'inhibition du réflexe de toux et à la présence de matériel étranger, l'utilisation d'antibiotiques et la sélection de germes résistants comme *C. albicans* ou *P. aeruginosa*. La plupart des ces modèles permettent toutefois d'évaluer la fonction respiratoire et ses perturbations au cours des PAVM, ainsi que l'hémodynamique et ses variations. Ils permettent également d'évaluer la lésion pulmonaire et la charge bactérienne pulmonaire (23).

Il n'existe aucun modèle animal qui puisse reproduire la complexité des facteurs favorisants des PAVM. Le modèle idéal associerait en effet une ou plusieurs défaillance d'organe (le motif d'entrée en réanimation), une antibiothérapie à large spectre qui favorise la colonisation par des germes multirésistants et *Candida*, une intubation oro-trachéale sous sédation, qui inhibe le réflexe de toux et introduit un corps étranger, source de biofilm, et un degré d'immunosuppression variable en fonction des comorbidités associées.

I. C. 4. La lésion pulmonaire

Du fait de sa finesse et de l'étroite relation entre sa structure et sa fonction, l'épithélium pulmonaire, ou plutôt l'ensemble endothélium-matrice extra-cellulaire-

épithélium alvéolaire que l'on appelle "barrière alvéolocapillaire" est très sensible aux lésions induites par différents stress, notamment la ventilation mécanique (barotraumatisme). Le principal déterminant de la gravité d'une pneumonie est le degré de lésion pulmonaire (24), qui détermine l'importance de la perte de fonction du poumon. Il existe de nombreux modèles de lésion pulmonaire chez l'animal (25), certains utilisant des pathogènes, d'autres des toxiques, voire la ventilation mécanique.

L'évaluation de la lésion repose principalement sur trois paramètres :

- Évaluation de la fonction : l'épithélium pulmonaire permet les échanges gazeux, mais permet également la résorption de l'œdème intra-alvéolaire, et ce grâce à des pompes Na/K ATPases qui évacuent le sodium de la lumière alvéolaire vers les capillaires sous-jacent (Figure 1). Au cours des pneumonies, la fonction de ces pompes va être augmentée pour résorber l'œdème. Mais lorsque les cellules se nécrosent, la fonction pompe va disparaître. Il est possible de mesurer la fonction de ces pompes *in vivo* et de calculer la clairance pulmonaire en instillant une solution saline hypertonique et un traceur fluorescent dont la concentration intra-alvéolaire augmentera de façon proportionnelle à l'activité des pompes NA/K ATPase (20).

- Évaluation de l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire : la lésion pulmonaire peut aboutir à une perte d'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire, soit par disjonction intercellulaire, soit par destruction tissulaire (Figure 1). Cette lésion peut être appréciée grâce à la diffusion d'une macromolécule couplée à un marqueur fluorescent du sérum vers l'espace alvéolo-interstitiel, représentant la perméabilité alvéolo-capillaire (26).

- Évaluation de l'œdème pulmonaire global : comparaison du ratio poids frais/poids sec du poumon entre les animaux contrôles et les animaux d'intérêt. Cette méthode est robuste, permettant de mettre en évidence des différences importantes, mais elle manque

de sensibilité (15,22,25).

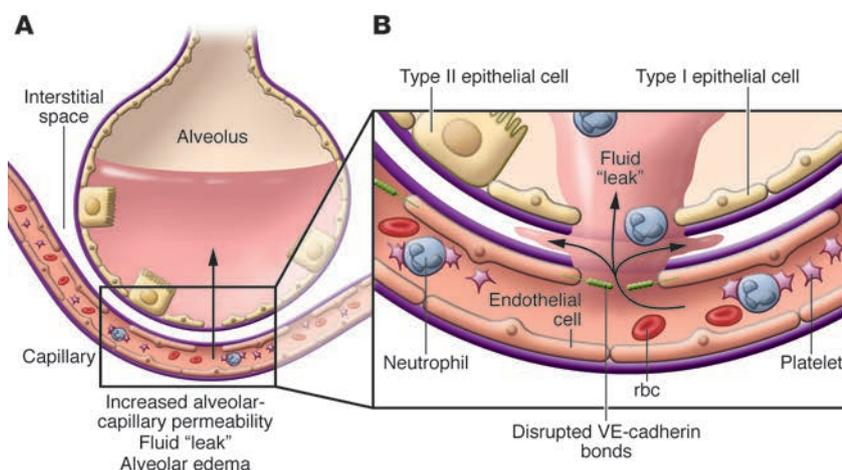


Figure 1. Physiopathologie des lésions de la barrière alvéolocapillaire. Adapté de (24).

I. C. 5. Choix du modèle

Les premiers modèles animaux de PAVM ont été développés pour effectuer des tests thérapeutique et comprendre la physiologie pulmonaire particulière sous ventilation mécanique dans les années 70-80 (27). Au fur et à mesure de la progression des connaissances, la physiologie a pris de moins en moins de place, et les études sont devenues plus mécanistiques, avec une exploration majoritaire de la lésion pulmonaire, sur des animaux toujours ventilés, mais de plus petite taille (lapins, rats) (28). Ces études ont montré que la réduction de la lésion pulmonaire permettait de diminuer la sévérité des pneumonies, même dans les modèles de PAVM (22). La tendance est donc à l'abandon des modèles utilisant des animaux de grande taille pour se tourner vers la souris, et l'utilisation de modèles aigus de pneumonie pour étudier la lésion pulmonaire (29).

L'inconvénient de cette évolution est son éloignement du modèle clinique initial. Mais la compréhension des mécanismes cellulaires et immunitaires mis en jeu nécessite une simplification du modèle, afin de limiter au maximum les facteurs confondants. Nous avons donc décidé d'utiliser un modèle aigu de pneumonie à *P. aeruginosa*, et d'utiliser le modèle de colonisation des voies aériennes par *C. albicans* mis en place dans le laboratoire, en l'absence de modèles convaincant de colonisation des voies aériennes par *C. albicans* dans la littérature (30-32).

II. *Candida albicans*

II. A. Caractéristiques microbiologiques

II. A. 1. Classification

Candida albicans est un eucaryote membre du règne des Fungi, ou champignons. Il appartient à la division des Ascomycètes, c'est à dire des champignons capables de former des asques (sacs contenant des cellules) et dans laquelle on retrouve de nombreux micromycètes (champignons microscopiques) pathogènes mais aussi des macromycètes comme les morilles ou les truffes. *C. albicans* entre dans la classe des Saccharomycètes, dans laquelle se trouve un grand nombre de micromycètes pathogènes humains (notamment *Aspergillus sp.*, *Histoplasma sp.* ou *Fusarium sp.*), et fait partie de l'ordre des Saccharomycetales, Famille des Saccharomycètes. Cette famille regroupe le genre *Saccharomyces* (dont *S. cerevisiae*, levure fermentant la bière et *S. boulardii*, levure du boulanger) et le genre *Candida* (Figure 2). C'est un champignon diploïde (33), dont le génome est divisé en 8 chromosomes. Il est capable d'un cycle parasexué, différent de celui

observé chez les champignons sexués comme *Saccharomyces*. Cependant son génome est hautement dynamique, ce qui est considéré comme un facteur d'adaptation.

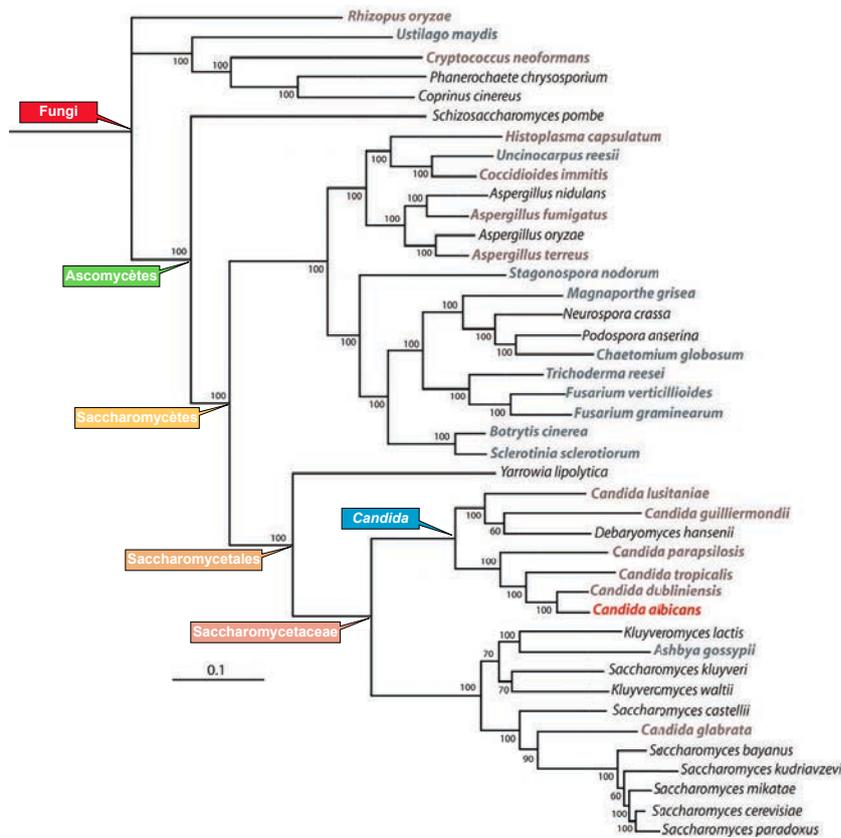


Figure 2.
Arbre phylogénétique de *C. albicans*. Adapté de (34)

II. A. 2. Morphologie

Dans la classification morphologique des champignons, il est rattaché aux levures. Il s'agit d'une levure dimorphique (ou polyphénique, littéralement "capable de prendre plusieurs caractéristiques"), du fait de sa capacité à passer de sa forme de levure, ovoïde à une forme branchée, dite pseudohyphe, et à une forme filamenteuse ou hyphe (Figure 3).

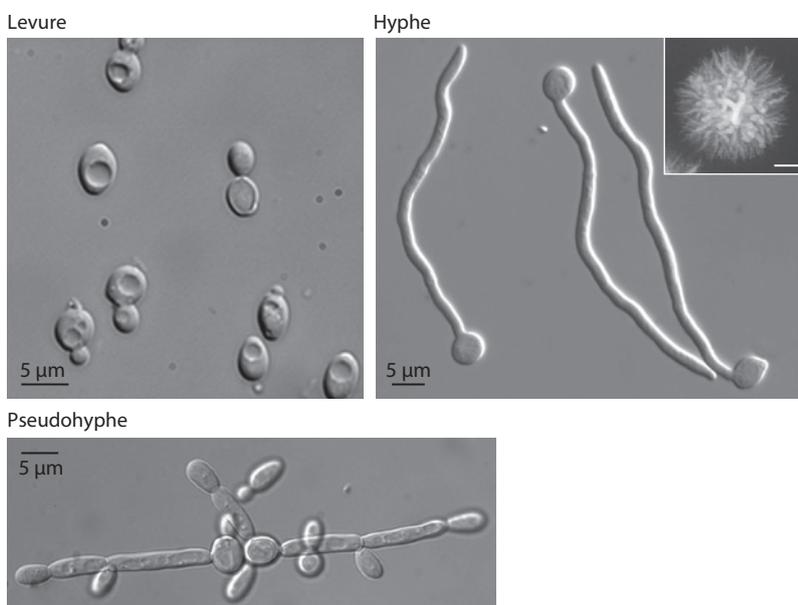


Figure 3 : Morphologies de *C. albicans*. Morphologie de la levure, de la forme hyphale (ou filamenteuse ou mycélium) et de la forme pseudo-hyphale (ou pseudo-filamenteuse ou pseudo-mycélienne). L'encart en haut à droite présente l'aspect d'une colonie filamenteuse. Adapté de (35).

La forme levure est ovoïde et mesure 3 à 10 μ m de diamètre, elle est immobile. Sa température de croissance idéale est de 30°C. A cette température, le temps de doublement est d'environ 2h. La température, le pH et la richesse du milieu influencent non seulement la vitesse de croissance mais également la morphologie de *C. albicans* : un milieu pauvre ou la présence de sérum seront par exemple responsables d'une transition vers la forme filamenteuse. Cette capacité à filamenter en présence de sérum animal a été mise à contribution pour l'identification de *C. albicans* en culture par les microbiologistes. L'isolement et la culture de *C. albicans* peut se faire sur milieux riches comme le milieu de Sabouraud ou le milieu Yeast Peptone Dextrose (YPD). Sur ces milieux, *C. albicans* forme en 18-24h des colonies de la taille d'une tête d'épingle, blanc crème et luisantes. Il tire son nom de cet aspect : en latin *Candida* et *alba* sont synonymes et signifient blanc. Elles dégagent une odeur acide caractéristique.

II. A. 3. Paroi

C. albicans est une levure non encapsulée, mais comme toutes les levures, sa membrane plasmique est renforcée par une paroi. Cette paroi permet à la levure de résister aux contraintes physicochimiques de son milieu. C'est une paroi composite formée de microfibrilles de polymères de sucres simples et de glycoprotéines. Ces microfibrilles sont liées entre elles par des liaisons hydrogène et forment une matrice tridimensionnelle complexe. Deux feuillets peuvent être distingués au sein de cette paroi : la paroi interne, au contact de la membrane plasmique confère au champignon sa rigidité et est composée d'un squelette de chitine et de β -1,3glucanes. La paroi externe est une matrice plus souple composée de Mannanes et de Mannoprotéines. Le lien entre les deux feuillets est assuré par les β -1,6 glucanes (36,37) (Figure 4). Au moment de la séparation des levures après division ou de la filamentation, certaines des molécules de la paroi interne peuvent se trouver exposées à la surface de *C. albicans* au niveau de "cicatrices". Le plus simple de tous les polymères de la paroi est la chitine : il s'agit d'un polymère linéaire de N-acétyl-glucosamine. Les mannanes forment une famille de molécules composées de polymères de Mannoses plus ou moins branchées. Les Glucanes sont une famille de molécule composées de polymères de glucose. Ils représentent 60% du poids sec de la paroi de *C. albicans*. En fonction de la façon dont les liaisons se font entre les molécules de glucoses, il peut s'agir de β -1,6 ou de β -1,3 glucanes. L'association de ces polymères à des protéines forme des complexes

polymoléculaire appelés mannoprotéines, composées de sucre à 90% (Figure 4). La structure de ces mannoprotéines est responsable des différents sérotypes décrits de *C. albicans* (37).

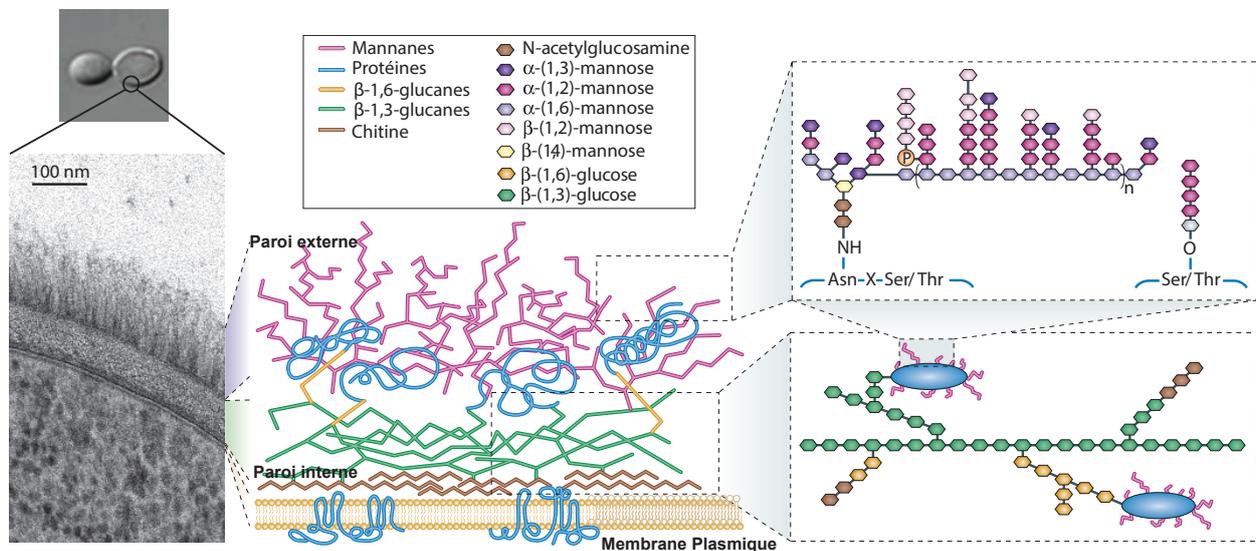


Figure 4 : Structure de la paroi de *C. albicans* au microscope électronique et schématisé au niveau moléculaire. Adapté de (35-37).

II. A. 4. Quorum Sensing

L'adaptation de la morphologie de *C. albicans* aux conditions physico-chimiques environnantes est liée des systèmes de reconnaissance et d'adaptation lui permettant de réagir à son milieu. Mais comme les bactéries, *C. albicans* est également capable de détecter les autres membres de son espèce, grâce à un système de communication chimique, que l'on appelle "Quorum Sensing" (QS). Le QS est un système de communication chimique développé au sein d'une même espèce, voire d'un même règne. Chaque cellule sécrète en continu une molécule diffusible. Cette molécule ne se fixera à son récepteur que lorsqu'une concentration seuil sera atteinte. Le récepteur activé est alors capable d'induire un comportement spécifique (expression génique, sécrétion de facteurs de virulence...). Plus le nombre de microorganismes est important, plus la concentration seuil sera atteinte rapidement. Cela permet de coordonner des actions à l'échelle d'une population, fongique ou bactérienne.

La recherche de ces molécules s'est développée suite à la constatation qu'au-delà d'une certaine concentration de cellules ($> 10^6$ Cellules/mm³), les stimuli habituellement capables d'induire une filamentation étaient inefficaces (38). Hornby *et al.* ont constaté qu'en conditions d'induction de filamentation, l'ajout de surnageant de culture de *C. albicans* inhibait la filamentation, mais pas la division des levures. Ils ont ainsi pu mettre en évidence que le farnesol, une petite molécule organique de la famille des sesquiterpène (formée à partir

d'unités isoprène) était responsable de cette inhibition de façon dose-dépendante (38) (Figure 5). L'inhibition de la synthèse de farnesol par *C. albicans* est responsable d'une filamentation, indépendamment du nombre de cellules. Le mécanisme impliqué serait une activation du gène Tup1 qui inhibe la filamentation (39).

Un autre alcool, le tyrosol, dérivé de la tyrosine a été mis en évidence en 2004. Produit lui aussi par *C. albicans*, il est responsable d'une diminution du délai de filamentation après dilution des cultures de *C. albicans* (40). Sa cible reste pour l'instant inconnue.

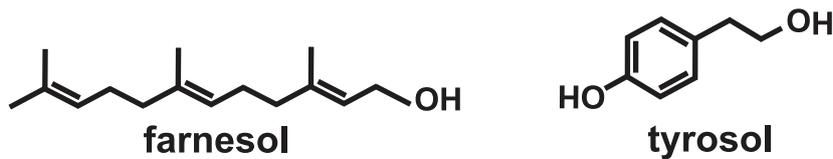


Figure 5 : Molécules du QS de *C. albicans*. Adapté de (41)

II. A. 5. Biofilm

Un biofilm est une matrice tridimensionnelle composée d'exopolymères formée lors de la croissance de micro-organismes sur une surface. *C. albicans* est capable de former des biofilms à la surface de matériaux inertes (plastiques) ou de composés organiques solides (dents, valves cardiaques) (42). La formation de biofilms protège *C. albicans* de la réponse immunitaire, mais aussi des micro-organismes concurrents ou des molécules antifongiques (43). La genèse de biofilms par *C. albicans* est étroitement liée à sa capacité de filamentation, et l'utilisation de farnesol inhibe la formation de biofilm (44).

II. B. Distribution, habitat

C. albicans est l'espèce fongique la plus fréquemment isolée chez l'homme et est détecté dans le tube digestif de 40% de la population occidentale (45,46). C'est un commensal du tube digestif des animaux à sang chaud, mais est capable de survivre plusieurs semaines dans l'environnement (47). L'acquisition se fait dès la naissance (42) mais dans les conditions physiologiques normales, sa distribution reste digestive. *C. albicans* reste au contact des cellules épithéliales, sans franchir cette barrière, on parle alors de colonisation.

II. C. Virulence

La paroi de *C. albicans* est un de ses premiers déterminants de virulence. En effet, elle lui permet d'adhérer aux cellules épithéliales. L'adhésion à la surface est l'étape préalable à l'envahissement tissulaire et à la formation de biofilm (48). L'adhésion se fait principalement

grâce à des protéines membranaires de la famille des Agglutinin-like sequences (ALS) et la Hyphal wall protein 1 (HWP1). Ces protéines se fixent sur des récepteurs spécifiques à la surface des cellules épithéliales (par exemple E-Cadhérine et N-Cadhérine pour ALS 3 (36). Ces molécules d'adhésion peuvent également, en se fixant sur les cadhérines induire l'endocytose de la levure ou du filament par les cellules épithéliales. L'inactivation de l'expression de ces protéines par *C. albicans* est responsable d'une diminution de l'adhésion et de la virulence dans des modèles murins d'infection systémique et localisée (49,50).

L'adhésion à l'épithélium déclenche aussitôt la filamentation (48) et la sécrétions de protéases (Secreted Aspartyl protéases). Ces protéases vont favoriser la pénétration des filaments mycéliens dans les tissus (51). Là encore, les mutants dépourvus de ces protéases ont une virulence atténuée, avec une capacité moindre à envahir les organes (52,53). Il s'agit du mécanisme de virulence principal de *C. albicans* et les mutants bloqués dans une phase (levure ou filamenteuse) sont non virulents (54). Cette filamentation permet à *C. albicans* d'envahir les tissus en traversant (Figure 6) les cellules par endocytose, ou en se frayant un chemin entre les cellules (36). Une fois le tissu envahi, et la circulation atteinte, la réversion de la forme filamenteuse vers une forme levure va permettre une dissémination à distance et l'installation de nouveaux foyers.

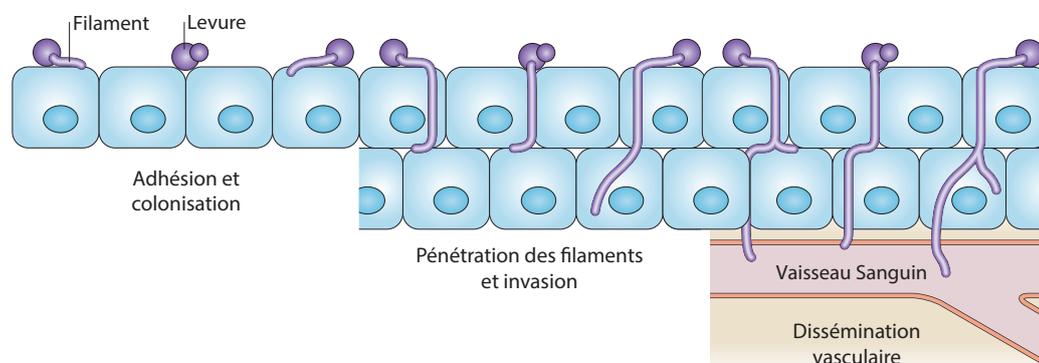


Figure 6. Filamentation: passage de la colonisation à l'infection. Après avoir adhéré à l'épithélium, *C. albicans* va filamenter et envahir les tissus en passant entre et à travers les cellules. Adapté de (36).

II. D. Pathogénicité

La candidose est l'infection à *C. albicans*. Elle est provoquée par l'envahissement de tissus stériles par *C. albicans*. Ces infections sont opportunistes, c'est à dire qu'elles surviennent toujours en présence de facteurs favorisant (cf. Tableau 1). Elles peuvent être précédées par la colonisation de sites non habituellement colonisés comme l'épithélium respiratoire ou la peau. On distingue classiquement les candidoses muqueuses et les

candidoses invasives. Ces deux types d'infections varient de par leurs signes clinique, leur gravité et leur physiopathologie.

II. D. 1. Candidoses muqueuses

Les candidoses muqueuses sont les plus fréquentes des candidoses. Hippocrate a fait une description de la candidose orale dès le V^{ème} siècle avant JC. Elles touchent les muqueuses colonisées de façon habituelle par *C. albicans*, c'est à dire les muqueuses orales, œsophagiennes et génitales. Les signes cliniques des candidoses muqueuses associent à des degrés variables : douleurs ou prurit, ulcération muqueuse et présence d'un enduit blanchâtre peu adhérent. Il existe par ailleurs des spécificités en fonction des sites touchés. En l'absence d'autres conditions favorisantes, ces candidoses n'évoluent jamais vers une candidose systémique et sont donc rarement associées à des signes généraux (fièvre).

Ces muqueuses sont constamment colonisées par des flores bactériennes commensales. Lors de la modification des conditions physico-chimiques locales, *C. albicans* peut également coloniser des sites habituellement indemnes de sa présence. C'est le cas de la peau située à l'intérieur des grands plis (ventre, sein, pli inguinal) chez les patients obèses ou diabétiques, où la macération va créer des conditions favorables au développement de *C. albicans*. *C. albicans* entre en compétition avec les bactéries commensales pour les ressources nutritionnelles et les sites d'adhésion. La perturbation de cet équilibre, notamment par l'utilisation d'antibiotiques, permet la prolifération de *C. albicans* puis l'effraction de la barrière épithéliale (47,55). En revanche, chez les patients de réanimation non neutropéniques, la présence de *C. albicans* est rarement synonyme d'infection, mais représente plutôt une colonisation (56).

Des études récentes ont mis en évidence le rôle du métabolisme du tryptophane dans ces interactions. Les bactéries commensales du tube digestif, et particulièrement *Bacillus sp.* sont capables d'utiliser le tryptophane comme source de carbone. Les catabolites du tryptophane générés interagissent avec un récepteur présent à la surface des lymphocytes intra-épithéliaux, l'Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR). La reconnaissance des métabolites du tryptophane par l'AHR est responsable d'une activation de l'immunité muqueuse et de la sécrétion d'IL-22 (57,58), une cytokine qui à un rôle protecteur sur les muqueuses au cours des infections (59). Dans un modèle murin d'infection gastrique à *C. albicans*, l'apport exogène de tryptophane permet une expansion de *Lactobacillus sp.*, la sécrétion d'IL-22 et l'apparition d'une résistance à la candidose gastrique (58). Le traitement par amoxicilline, qui tue une partie de la flore bactérienne commensale, dont les Lactobacilles, est associé à une

perte de l'effet protecteur induit par le tryptophane. Ce mécanisme physiopathologique pourrait expliquer la croissance de *C. albicans* lors des traitements antibiotiques actifs sur le microbiome intestinal.

II. D. 2. Candidoses invasives

On parle de candidose invasives ou systémiques lorsque *C. albicans* est isolé d'un site normalement stérile (sang, biopsie profonde, LCR...). *C. albicans* est le quatrième micro-organisme isolé dans les hémocultures en terme de fréquence. Les candidoses invasives représentent 73% de toutes les infections fongiques invasives aux USA (60) et sont associées avec une mortalité importante, proche de 40% chez les patients non neutropéniques (60,61). Les signes cliniques des candidoses invasives sont non spécifiques, et se résument le plus souvent à de la fièvre. Ces signes varient en fonction des organes touchés (endocardite, candidose hépato-splénique, endophtalmie...)

Les candidoses invasives surviennent fréquemment après la colonisation de la peau saine et/ou de muqueuses habituellement indemne de *C. albicans* (trachée, bronches). Cependant, cette colonisation est rarement suffisante et la présence d'une atteinte de l'intégrité de la barrière épithéliale (chirurgie, brûlure, cathéter) ou d'une atteinte grave du système immunitaire (neutropénie) est nécessaire (62). Dans les modèles animaux, il a même été montré qu'en l'absence de lésions intestinales, la neutropénie n'était pas suffisante pour induire une candidose invasive (63).

Lors d'une brèche de la barrière épithéliale, le passage des levures se fait directement de la zone colonisée (peau, muqueuse) vers la circulation sanguine. Chez les patients immunodéprimés, lorsque les filaments de *C. albicans* envahissent la muqueuse, et traversent la barrière, le défaut de recrutement des neutrophiles va permettre à *C. albicans* d'atteindre les vaisseaux sous-muqueux (64,65). La dissémination se fait alors par voie hématogène, sous forme de levure. Lorsque les levures atteignent la circulation capillaire, elle vont à nouveau filamenter et envahir les organes à distance du point d'entrée. La présence de filaments sur l'examen histologique est caractéristique du caractère invasif de *C. albicans* (65).

II. E. Facteurs favorisants & Réponse de l'hôte

Les candidoses surviennent toujours en présence de facteurs favorisant (Tableau 1). Certains de ces facteurs, détaillés plus hauts, dépendent des conditions physico-chimiques et

de la flore muqueuse associée à *C. albicans*. Mais d'autres facteurs sont liés à l'hôte. L'étude de ces facteurs a permis de décrypter la réponse immunitaire dirigée contre *C. albicans*.

Facteur favorisant	Candidose cutanéomuqueuse	Candidose systémique
Déficit immunitaire	Atteinte de l'immunité T	Neutropénie
	Déficit immunitaires rares (Voie de l'IL-17...)	
Modification des conditions physico-chimiques	Dispositifs médicaux implantables (Sonde urinaire, tube endotrachéal...)	Nutrition parentérale
	Obésité	
	Diabète	
Atteinte de l'intégrité tissulaire		Chirurgie abdominale
		Cathéter veineux central
		Brûlures, ulcères
Modification de la flore commensale	Antibiothérapie	
	Maladie chronique du poumon ou du tube digestif (Mucoviscidose)	

Tableau 1. Facteurs favorisant des candidoses.

II. E. 1. Mécanismes déduits de pathologies humaines

II. E. 1. α. Candidoses muqueuses

Lors de l'apparition du VIH dans les années 80, la candidose muqueuse (orale ou œsophagienne) a été établie comme l'une des infections définissant le SIDA. Mais de façon surprenante, l'immunodépression T viro-induite ne s'accompagnait pas d'une augmentation de l'incidence des candidoses invasives (66). Par ailleurs, les patients souffrant d'un déficit touchant spécifiquement l'immunité T (Immunodépression combinée sévère) sont également plus susceptibles aux infections candidosiques cutanéomuqueuses (67). Il a été montré que les lymphocytes T-CD4 étaient nécessaires à la limitation de la prolifération de *C. albicans* à la surface des muqueuses et qu'en l'absence de restauration immunitaire, les traitements antifongiques étaient insuffisants pour éradiquer complètement l'infection (66).

Des travaux ultérieurs ont permis de mettre en évidence qu'une sous-population de lymphocyte T-CD4, les Lymphocytes T helper 17 (T_H17) était responsable de la protection muqueuse (68). La réponse T_H17, décrite en 2005 est caractérisée par la sécrétion d'IL-17 (de

A à F), d'IL-22 et d'IL-23. Cette réponse est importante pour l'immunité muqueuse réactionnelle aux infections à pyogènes et mycosique. Les déficits immunitaire acquis ou constitutionnels en IL-17F ou du récepteur de l'IL-17A sont associés avec la survenue d'une candidose cutanéomuqueuse chronique (69).

D'autres déficits immunitaires sont associés avec une incidence accrue d'infections fongiques cutanéomuqueuse, notamment candidosique. Il s'agit de mutations affectant les récepteurs de motifs associés aux pathogènes (Pathogen Associated Molecular Pattern ou PAMP) ou les molécules de signalisations (70). Ces récepteurs sont appelés récepteurs de reconnaissance des motifs (Pattern recognition receptor, PRR) car ils reconnaissent des motifs invariants communs aux pathogènes (par exemple le lipoPolySaccharide ou LPS bactérien, les phospholipomannanes fongiques). Ils sont divisés en plusieurs familles en fonction de leur structure, de leur localisation cellulaire, du type cellulaire et des adaptateurs qui permettent la signalisation intracellulaire.

La famille la mieux connue de PRR est la famille des Toll-like receptor (TLR). La plupart de ces récepteurs sont extracellulaires et signalent via un adaptateur appelé MYD88. La stimulation de ces récepteurs va aboutir à une activation de la cellule (lymphocyte, Polynucléaire, Macrophage) et à la synthèse de cytokines de la famille de l'IL-17 (IL-17, IL-22, IL-23). Au cours des infections fongiques et notamment des candidoses, il a été montré que TLR2 et TLR4 étaient capable de reconnaître respectivement les Mannanes et les β -glucanes (37). Mais si l'implication de TLR2 et TLR4 ont été montrés chez la souris dans la réponse contre *C. albicans* (68), aucun déficit immunitaire lié au défaut de l'un de ces récepteurs n'a encore été décrit.

En revanche, les atteintes constitutionnelles d'autres PRR, notamment de Dectin 1, un PRR de la famille des récepteurs lectine de type C (C-type lectin receptor ou CLR) capable de reconnaître les β -glucanes, ou de molécules de transduction du signal comme CARD9 ou MYD88, transmettant le signal en aval de Dectin 1 ou des TLR, sont associés à l'apparition d'une candidose cutanéomuqueuse chronique (70,71). Le contrôle de la prolifération de *C. albicans* au niveau muqueux nécessite donc des PRR fonctionnels, ainsi que la capacité de monter une réponse T helper efficace de type T_H17 .

Récemment, De luca *et al.* Ont mis en évidence le rôle d'une autre cytokine en réponse à une infection par *C. albicans* : il s'agit de l'IL-22 (72), une cytokine exprimée lors de la réponse T_H17 et dont le rôle principal est le remodelage épithélial et la sécrétion de peptides antimicrobiens par l'épithélium. Cette étude reste cependant à confirmer

II. E. 1 β . Candidoses invasives

Outre les effractions de la barrière cutanéomuqueuse, détaillées dans le tableau 1, deux situations particulières sont associées avec un risque accru de candidose invasive. Il s'agit de la neutropénie immunoallergique ou toxiques et d'atteintes constitutionnelles de la fonction phagocyte des macrophages (73) ou des neutrophiles. Les neutrophiles et les macrophages sont en effet les effecteurs finaux de la réponse contre *C. albicans*, et la candidose invasive en l'absence de *neutrophiles* est constamment mortelle.

II. E. 2. Modèle intégré de la réponse à *C. albicans*

Reconnaissance de Candida

C. albicans exprime à sa surface un certain nombre de PAMPS qui sont susceptibles d'être reconnus par les PRR. Les mannoprotéines qui sont situées le plus à l'extérieur de la paroi fongiques sont celles qui ont le plus de probabilité d'être reconnues. Mais la présence de β -glucanes et de chitine au niveau des cicatrices de division permet également leur expositions aux PRR. Enfin, l'invasion tissulaire par *C. albicans* est un facteur d'activation de la réponse immunitaire innée par le relargage de chémokines et de débris cellulaires par les cellules détruites.

La reconnaissance de *C. albicans* fait appel à un grand nombre de PRR, plus ou moins spécifiques, plus ou moins redondants et exprimés à la surface de différentes cellules. La stimulation de ces PRR va conduire à des réponses différentes en fonction de l'état de *C. albicans*, mais aussi en fonction de la cellule et de l'endroit où se déroule le contact. Les principales cellules capables de reconnaître *C. albicans* sont les monocytes et les macrophages (74). Ils expriment un grand nombre de PRR et à une forte densité, notamment des TLR et des CLR. Le niveau d'expression de ces molécules peut être influencé par le niveau d'activation des macrophages, les macrophages inflammatoires exprimant plus de PRR que les macrophages résidents (37).

Les mannanes et les mannoprotéines sont reconnus par TLR4 et le Mannose Receptor (MR) des macrophages (37). L'activation de ces récepteurs va permettre le recrutement d'adaptateurs et notamment du Myeloid Differentiation primary response gene 88 (MYD88). Cet adaptateur est responsable de l'activation de la voie NF κ B et de la sécrétion de cytokines de la voie T_H17, à savoir la pro-IL-1 β , l'IL-17, l'IL-22 et l'IL-23 (72). Ces cytokines sont responsables du recrutement des polynucléaires neutrophiles, de l'activation des cellules dendritiques et des macrophages et de la synthèses par l'épithélium de peptides

antimicrobiens (75). Les études chez la souris et des déficit immunitaires chez l'homme ont montré que l'atteinte de l'IL-17, de l'IL-22 ou de leurs récepteurs était responsable d'une susceptibilité accrue aux infections par *C. albicans* (76).

Les β -glucanes sont reconnus par TLR2 et par Dectin 1. Le rôle de TLR2 reste pour l'instant controversé dans les études concernant l'immunité contre *C. albicans* (37). En revanche Dectin 1 est un PRR majeur dans la réponse à *C. albicans*, son absence étant également associée à une susceptibilité accrue aux candidoses cutanéomuqueuses (71). Dectin 1 recrute un adaptateur appelé Spleen tyrosine kinase (SYK ou CARD9) qui va activer un complexe macromoléculaire appelé inflammasome (77). L'inflammasome est un assemblage moléculaire composé de récepteurs intracellulaires de la famille des Nuclear oligomerization domain Like Receptor (NLR) capable lorsqu'il est activé de cliver une enzyme, la procaspase 1, en caspase 1 active. Cette caspase 1 est capable par son activité de protéase, de transformer la pro-IL1 β inactive en IL-1 β active. La pro-IL-1 β est synthétisée après activation de la voie NF κ B. Sa sécrétion sous forme active nécessite un deuxième signal, fourni par l'activation de l'inflammasome (77-79). L'activation de la caspase 1 peut également être responsable d'une forme particulière de mort cellulaire, responsable d'une inflammation : la pyroptose (80). La sécrétion d'IL-1 β par les macrophages va renforcer l'induction de la réponse T_H17 (81).

Après sa reconnaissance, *C. albicans* va être phagocyté par les macrophages ou par les polynucléaires neutrophiles (PNN) recrutés et tués par l'explosion oxydative générée par ces derniers (37). L'opsonisation par des anticorps et par le complément est important pour la phagocytose de *C. albicans*.

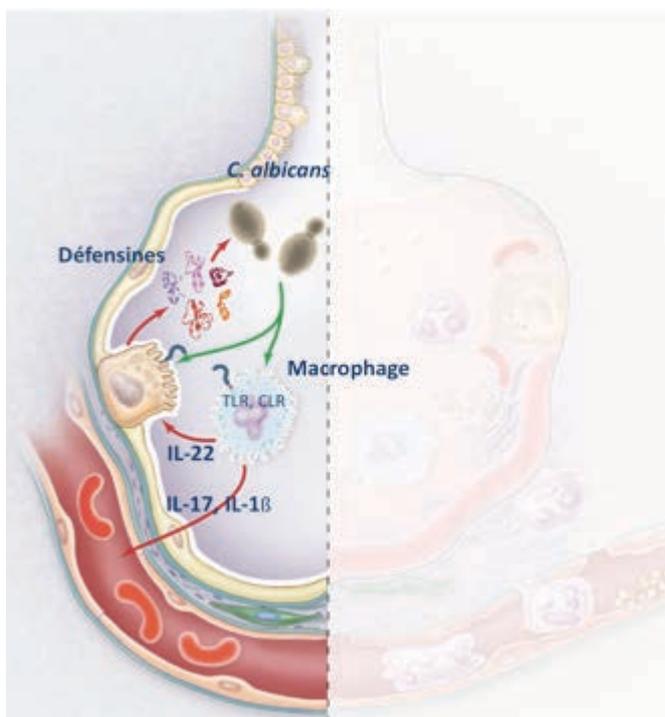


Figure 7 : Modèle simplifié de la réponse induite par *C. albicans* au niveau pulmonaire. Adapté de (14)

III. *Pseudomonas aeruginosa*

III. A. Caractéristiques microbiologiques

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) a été décrit pour la première fois en 1872 par Schroter, qui a décrit une bactérie capable de produire un pigment bleu hydrosoluble dans le pus et sur des pommes de terres bouillies, et l'a appelé *Bacterium aeruginosum* (82). *Aeruginosa* signifie "vert-de-gris" en latin, et désigne la teinte du cuivre oxydé. L'isolement bactérien sera fait 10 ans plus tard par Gessard, qui le nomme *Bacillus pyocyaneus*. Ce nom sera conservé jusqu'aux années 60 (83). *P. aeruginosa* est un bacille Gram négatif de 1,5 à 3µm de long, mobile grâce à un flagelle unipolaire qui lui permet de se déplacer en milieu liquide. Il possède également des pili C'est un aérobie facultatif puisqu'il peut utiliser le nitrate comme accepteur final d'électron dans sa chaîne respiratoire en l'absence d'oxygène. Il se reproduit par division, et sa température de division optimale est de 37°C (mais il est capable de se diviser jusqu'à 42°C), avec un temps de doublement *in vitro* de 40 minutes (84).

Il est capable de pousser sur un grand nombre de milieux, formant des colonies grises, lisses, avec une teinte verdâtre, produisant une odeur caractéristique. Il est décrit comme versatile, c'est à dire capable de croître dans un grand nombre de niches écologiques et conditions différentes. Lors de la croissance en milieu liquide, il sécrète de la pyocyanine qui va teinter le milieu de culture en vert. *P. aeruginosa* a un génome de 6,26 Mb réparti sur son chromosome unique (85), codant pour environ 5600 gènes. Ce génome est très plastique puisque l'identité entre les souches est d'environ 70%.

P. aeruginosa appartient à la division des protéobactéries, qui sont toutes des Gram négatifs, classe des γ -protéobactéries, dans laquelle se trouvent la plupart des bacilles Gram – pathogènes pour l'homme. *P. aeruginosa* appartient à l'ordre des pseudomonadales dans lequel on trouve, outre la famille des Pseudomonaceae, celle des Moraxellaceae contenant *Moraxella catharrhalis* et *Acinetobacter spp.* (Figure 8).

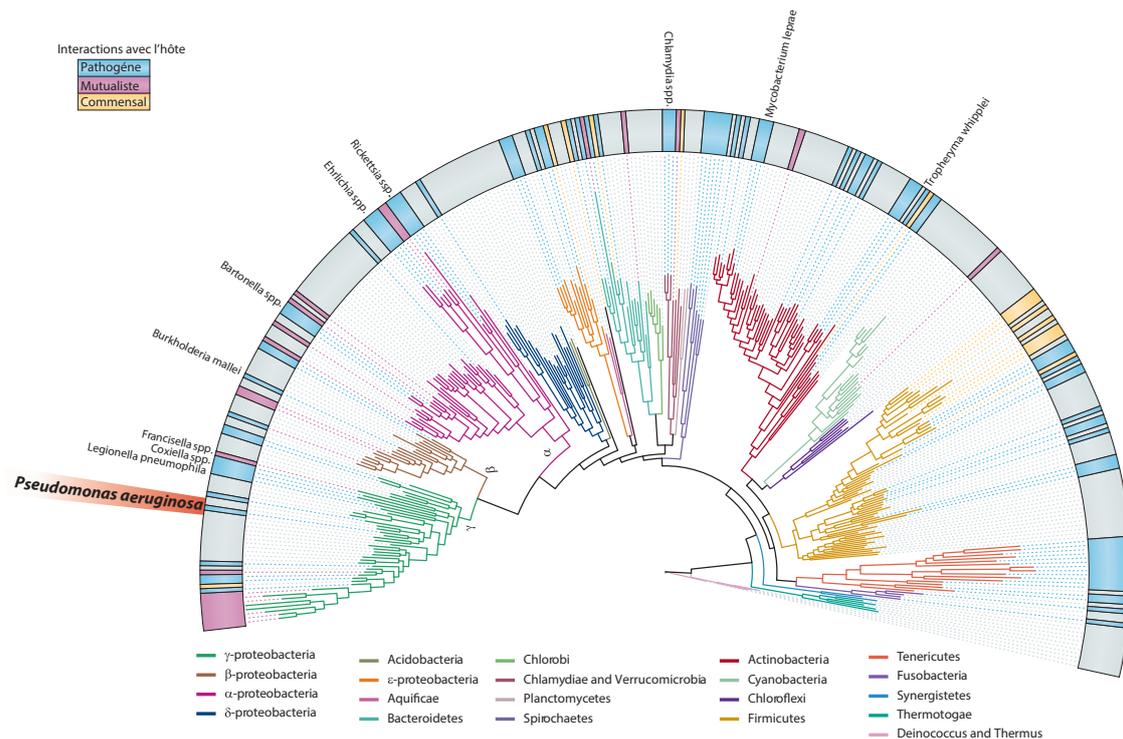


Figure 8. Arbre Phylogénétique de *P. aeruginosa*. Adapté de (86).

III. B. Distribution, habitat

P. aeruginosa est lié à l'élément aquatique et son habitat est extrêmement diversifié, suivant la distribution de l'eau dans un grand nombre de niches écologiques : mer, rivières, réseaux domestiques. (87). Il colonise également de façon occasionnelle et transitoire le tube digestif de la plupart des animaux. Sa présence dans des niches écologiques aussi variées s'explique principalement par sa capacité d'adaptation aux changements rapides de conditions physicochimiques et à ses facteurs de virulence qui lui permettent de lutter efficacement contre les autres micro-organismes pour accéder aux ressources (88,89).

Dans la nature, *P. aeruginosa* existe rarement sous forme planctonique, libre, mais plutôt sous la forme de biofilm. Le biofilm est, comme pour *Candida*, composé du micro-organisme lui-même, mais également d'une matrice tridimensionnelle d'alginate, de polysaccharides et d'ADN (90) (Figure 9). Cette formation lui permet de mieux résister aux stress physico-chimiques environnementaux (température, dessiccation, pH...) mais aussi aux agressions extérieures (amibes, polynucléaires neutrophiles) et aux toxiques. Le biofilm est important dans la pathogénie de *P. aeruginosa* car il lui permet de persister sur les dispositifs médicaux implantables et de constituer un réservoir, notamment dans les hôpitaux et de résister aux antibiotiques et aux désinfectants. Il est directement impliqué dans la pathogénicité de *P. aeruginosa* dans la mucoviscidose et les infections sur matériel.

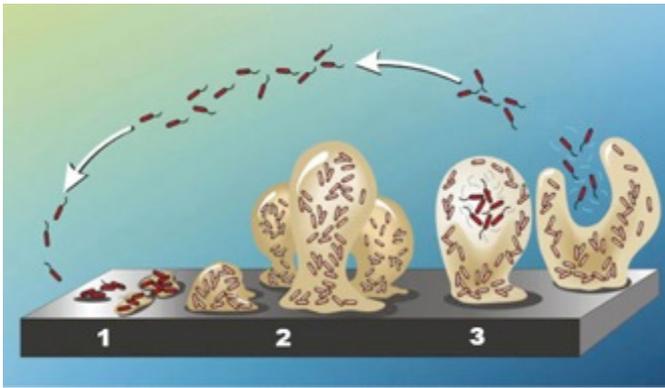


Figure 9. Biofilm de *P. aeruginosa*.

1. adhésion initiale au support et production de substance polymérique extracellulaire permettant une adhésion irréversible. 2. Développement de l'architecture du biofilm et maturation. 3. Dispersion de bactéries planctoniques à partir du biofilm. Adapté de (91).

III. C. Virulence

III. C. 1. Quorum Sensing

P. aeruginosa secrète en permanence de petites molécules appelées auto-inducteurs qui diffusent librement à travers sa paroi. La concentration de ces molécules s'accroît progressivement avec le nombre de bactéries présentes. *P. aeruginosa* possède des récepteurs intra-cytoplasmique à ces auto-inducteurs. Lorsque la concentration de ces auto-inducteurs dépasse un seuil, les récepteurs vont, via des facteurs de transcription, activer des gènes, principalement des gènes de virulence. Ce système de coordination de l'expression des facteurs de virulence est appelé Quorum Sensing (QS) et est répandu chez la plupart des bactéries (92). Cela permet aux bactéries de coordonner leurs comportements et de renforcer l'efficacité des protéines sécrétées. Les auto-inducteurs de *P. aeruginosa* sont de 2 types : les homo-sérine lactones (soit à 4 carbones : C4 HSL, soit à 12 carbones : C12 HSL) et le Pseudomonas Quinolone Signal (PQS) (93). Chacune de ces trois molécules a un récepteur spécifique. Trois systèmes de QS ont ainsi été décrits chez *P. aeruginosa* : le système Las, le système Rhl et le système PQS (Figure 10). Ces systèmes contrôlent entre 8 et 10% du génome de *P. aeruginosa* (94).

Le système LasI/LasR est le premier système à avoir été décrit. LasI est une enzyme intervenant dans la synthèse du C12 HSL, LasR est le récepteur du C12 HSL. L'activation de LasR entraîne la transcription de gènes impliqués dans la formation du biofilm, de l'élastase, de la lipase et de l'exotoxine A(95). Par ailleurs le système LasI/LasR active également la production de C4 HSL, et donc le système Rhl (96).

Le système RhlI/RhlR est le deuxième système à avoir été mis en évidence chez *P. aeruginosa*. RhlI est une enzyme intervenant dans la synthèse des C4 HSL et RhlR est le récepteur du C4 HSL. L'expression du système RhlI/RhlR est influencée par le système LasI/LasR (97). L'activation de RhlR entraîne l'expression de l'exo-enzyme S et de gènes

impliqués dans la production des rhamnolipides. Il régule également le système PQS et donc l'expression de pyocyanine (96).

Le système PQS est plus complexe que les autres systèmes, avec un opéron multigénique plutôt qu'un gène impliqué dans la synthèse de l'auto-inducteur. L'auto-inducteur se fixe sur son récepteur, PqsR qui conduit à l'expression de l'adhésine de la famille des lectines LecA et de gènes impliqués dans la synthèse de la pyocyanine. Le PQS est sous la dépendance des systèmes LasI/LasR et RhII/RhIR (96).

Le QS est important *in vivo* notamment dans les infections chroniques comme la mucoviscidose. L'utilisation de molécules inhibant le QS, comme par exemple l'azithromycine permet une diminution de la fréquence des exacerbations bactériennes (98). Le développement d'inhibiteurs du QS est une piste envisagée comme nouvelle stratégie anti-infectieuse et est actuellement en cours de développement (99).

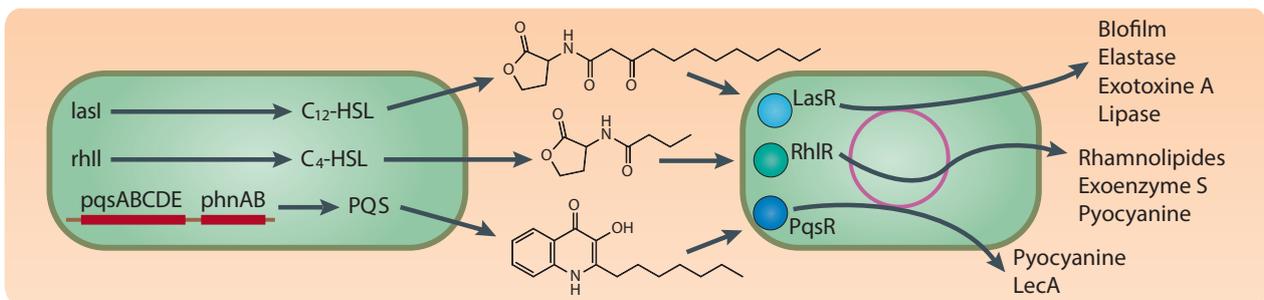


Figure 10 : Quorum Sensing de *P. aeruginosa*. Adapté de (100)

III. C. 2. Facteurs de Virulence (Figure 11)

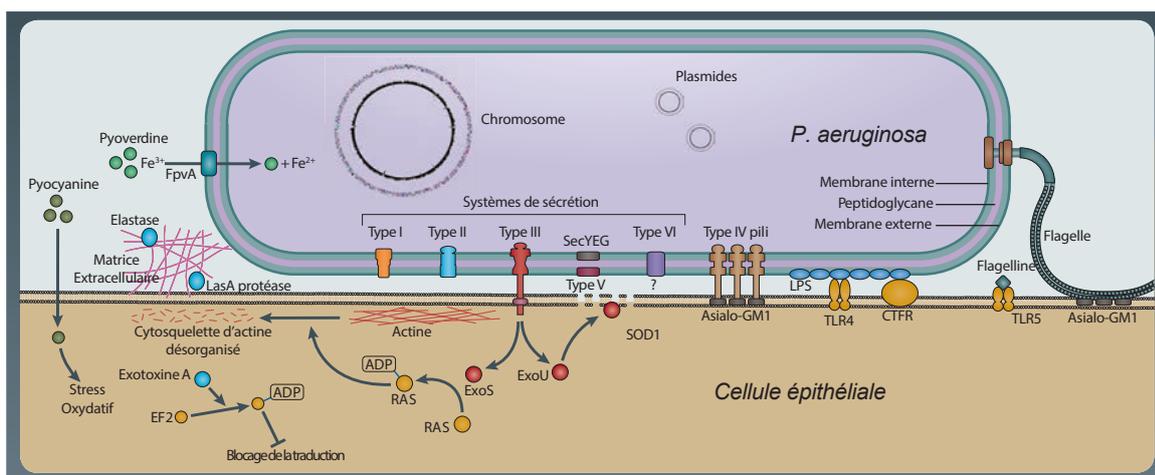


Figure 11. Facteurs de virulence de *P. aeruginosa*. Adapté de (100)

P. aeruginosa possède un grand nombre de facteurs de virulence qui vont lui permettre d'établir une infection. La plupart de ces facteurs de virulence sont sous la

dépendance du QS et sont exprimés de manière coordonnée. Il existe deux types de facteurs de virulence : les facteurs sécrétés (toxines, enzymes, pigments) et les facteurs constitutionnels (pili, molécules d'adhésion) (101). Les facteurs sécrétés le sont à travers des assemblages protéiques transmembranaires spécifiques appelés système de sécrétion (SST). Il existe 6 types de système de sécrétion (SST1-6) chez *P. aeruginosa* (102).

III. C. 2. α. Facteurs sécrétés

Les pigments

Les deux pigments plus produits et les plus étudiés sont la pyoverdine et la pyocyanine. La pyoverdine est un sidérophore, c'est à dire un récepteur soluble au fer, capable de le chélater jusqu'à sa récupération par la bactérie. Si la pathogénicité directe de la pyoverdine reste débattue, elle participe cependant à la virulence globale de la bactérie (103).

La pyocyanine est responsable de la couleur du pus de *P. aeruginosa*. Sa fonction première serait une maîtrise de l'environnement RedOx de la bactérie. Mais la pyocyanine a une toxicité directe sur les cellules eucaryotes. Des études *in vitro* ont montré que la pyocyanine inhibait la respiration cellulaire, les fonctions ciliaires et induisait l'apoptose des Polynucléaires neutrophiles (104). Des études *in vivo* ont également montré que les souches ne produisant pas de pyocyanine induisaient moins de dommages tissulaires que les souches sauvages (105).

Rhamnolipides

Les Rhamnolipides ou hémolysine sont des glycolipides produits sous la dépendance du système Rhl. Les Rhamnolipides sont sécrétés à travers le SST5 (102). Ils ont une activité détergente sur les membranes plasmiques et sont capables d'induire une hémolyse et une apoptose des PNN *in vitro* (94,106). Par ailleurs, les rhamnolipides sont nécessaires à une forme de déplacement en milieux visqueux de *P. aeruginosa* appelée swarming (107). Une association entre l'expression des rhamnolipides et les pneumopathies a été mise en évidence par Köhler *et al.* (98).

Exotoxine A

L'exotoxine A est sécrétée à travers le SST2. C'est une enzyme composée de 2 sous unités : une unité catalytique et une unité servant à la translocation dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Elle a une activité ADP-ribosyl transférase qui inhibe l'activité de la protéine Elongation Factor 2, ce qui aboutit à un arrêt de la synthèse des protéines en

intracellulaire. Dans des modèles animaux, le contact de la toxine purifiée avec la cornée entraîne la nécrose de celle-ci en quelques heures. Cependant, des souches infectantes pouvant être dépourvues de cette toxine, sa contribution à la pathogénicité reste à déterminer (108).

Elastase

L'élastase est une enzyme extracellulaire avec une activité protéolytique, capable de dégrader les composants de la lame basale des épithélium (élastine, collagènes de type III & IV, laminine...). Il existe en fait 2 protéines avec des activités similaires : LasA et LasB. Ces enzymes sont sécrétées via le SST2 et sont sous la dépendance du système QS Las. Ces enzymes représentent l'activité protéolytique majeure de *P. aeruginosa*, et leur importance dans l'établissement d'infection a été démontrée à la fois avec la toxine pure et des souches déficientes pour LasA et LasB dans des modèles de pneumonie (102,108,109).

Exotoxine S, T, U & Y

Les exotoxines S, T, U et Y ont en commun d'être sécrétées à travers le SST3. Le SST3 est un complexe multi-protéique encodé et contrôlé par 5 opérons contenant 36 gènes différents. Ce complexe compose une aiguille capable de pénétrer la membrane des cellules eucaryotes et d'y injecter des exotoxines (110). Ce complexe est partagé par différents bacilles Gram négatif, notamment *Shigella sp.* et *Yersinia sp.* Le complexe à lui tout seul pourrait être toxique pour les cellules en activant l'inflammasome (111). Exo S et exo T sont deux enzymes ayant une parenté de structure. Elles portent 2 activités : une activité GTPase et une activité ribosyl transférase. Elles sont responsables d'une disruption du cytosquelette d'actine (110). Exo Y est une adénylate cyclase qui va augmenter la quantité d'AMP cyclique, contribuant à la perturbation de nombreuses voies régulées par cette molécule. ExoU est la plus puissante des toxines sécrétées via le SST3 : c'est une enzyme avec une activité phospholipase capable de dégrader la membrane plasmique des cellules eucaryotes. Elle entraîne la nécrose des cellules en quelques minutes. ExoU est la seule toxine dont la présence ait un impact en clinique (facteur de gravité au cours des pneumonies à *P. aeruginosa*) (110).

III. C. 2. β . Facteurs constitutionnels

Il s'agit principalement des pili, qui permettent à la fois l'adhésion de *P. aeruginosa* et son déplacement sur des surfaces : twitching et swarming (112). Il s'agit également des

molécules d'adhésion telles que les lectines LecA et LecB. Ces protéines sont indispensables à la cytotoxicité de *P. aeruginosa in vitro* et sont contrôlées par le QS (113). Dans un modèle murin de pneumonie à *P. aeruginosa*, Chemani *et al.* ont montré que l'inhibition des lectines ou l'utilisation de souches déficientes pour leur production s'accompagnait d'une diminution de la gravité de l'infection (114).

III. D. Pathogénicité, facteurs favorisants

Malgré cet arsenal impressionnant de facteurs de virulence, *P. aeruginosa* n'est quasiment jamais pathogène pour l'immunocompétent (115). L'infection à *P. aeruginosa* survient toujours en présence de facteurs favorisants que sont :

- L'atteinte de l'intégrité épithéliale : principalement chez les brûlés, *P. aeruginosa* étant la bactérie la plus fréquemment responsable du décès lors d'une septicémie chez ces patients (116).
- L'immunodépression : principalement la neutropénie (117). Toutes les formes d'immunodépression (constitutionnelle, viro-induite, sepsis, iatrogène) augmentent le risque d'infection à *P. aeruginosa* (8).
- La stagnation des sécrétions bronchiques : cette condition est rencontrée dans un grand nombre de pathologies pulmonaires, notamment la mucoviscidose, la broncho-pneumopathie chronique obstructive, la dilatation des bronches et l'intubation orotrachéale. Dans ces conditions, *P. aeruginosa* est capable de coloniser les bronches et d'y former du biofilm. Il est également responsable de pneumopathies inaugurales ou exacerbant une colonisation chronique. Dans ces situations, il est toujours associé à un pronostic(8,108).
- L'antibiothérapie à large spectre : *P. aeruginosa* ayant un profil de résistance à de nombreux antibiotiques, leur utilisation va sélectionner des clones résistants responsables d'infection. Cependant, l'antibiothérapie à large spectre n'est jamais suffisante seule pour entraîner une infection. L'une des autres conditions suscitées est nécessaire en plus (8).

III. E. Réponse de l'hôte

La réponse immunitaire dirigée contre *P. aeruginosa* est une réponse aspécifique, mais qui permet dans la plupart des cas une clairance efficace de la bactérie. Les deux modèles les plus répandus d'infection à *P. aeruginosa* sont le modèle d'infection cornéen et pulmonaire.

Seront détaillés principalement ici les mécanismes qui ont été mis en évidence dans la réponse à l'infection pulmonaire aiguë.

Comme cela a été décrit plus haut, lorsqu'une bactérie parvient dans l'espace alvéolaire, ses PAMPs sont reconnus et elle est phagocytée. *P. aeruginosa* possède un grand nombre de PAMPs qui sont reconnus par les cellules immunitaires. Le LPS et le peptidoglycane pariétaux sont reconnus par TLR2 et TLR4 (118,119), la flagelline composant le flagelle est elle reconnue par TLR5 (120). Il existe une redondance importante des PRR et de leur signalisation. Ainsi, la délétion expérimentale d'un seul PRR ne s'accompagne que rarement d'une modification du phénotype. En revanche, la délétion d'adaptateurs tels que MYD88 est responsable d'une diminution de la synthèse de cytokines, et de la clairance bactérienne (119). L'activation de ces récepteurs permet la phagocytose, mais en l'absence de signaux de danger, aucune réponse inflammatoire ne sera déclenchée.

Si la bactérie est suffisamment virulente ou présente à un inoculum suffisant, elle va créer des lésions tissulaires et provoquer la sécrétion d'IL-1 β en réponse à ces lésions. L'activation des TLR et du récepteur à l'IL1 β recrute l'adaptateur MYD88 qui va à son tour activer la voie NF κ B et permet la sécrétion de cytokines de la voie T_H17 (IL-17, IL-22, IL-23). Ces cytokines ont un effet chimotactique et activateur sur les PNN qui vont migrer en intra-alvéolaire. Ce recrutement est indispensables pour la clairance bactérienne alvéolaire (117,121). L'épithélium pulmonaire va lui aussi être activé par la détection des PAMPs et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-22. La réponse induite est une augmentation des molécules d'adhésion, la sécrétion de chémokines et la synthèse de peptides antimicrobiens. Ces peptides ont une action bactéricide directe. Les mieux connus de ces peptides sont les défensines (α & β) et la cathelicidine. Il a été montré que l'inactivation des peptides, soit directement soit via un blocage de l'IL-22 était responsable d'une susceptibilité accrue des souris aux pneumonies à Bacilles Gram - (122-124).

Ainsi, la réponse immunitaire au cours de la pneumonie à *P. aeruginosa* repose principalement sur le recrutement alvéolaire de PNN, dépendant de la sécrétion d'IL-17 et d'IL-1 β , et la synthèse de peptides antimicrobiens, dépendante de l'IL-22. Ces deux mécanismes permettent une clairance bactérienne rapide, le confinement du foyer infectieux et la préservation de la fonction d'organe.

IV. Interactions entre *C. albicans* & *P. aeruginosa*.

Ce chapitre a fait l'objet d'une revue dans Médecine et maladies infectieuses en Avril 2013. (Med Mal Infect. 2013 Apr;43(4):146-51. doi: 10.1016/j.medmal.2013.02.005. Epub 2013 Apr 23). L'article a été retiré pour les besoins de la diffusion en ligne.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

MATÉRIEL & MÉTHODES

A moins d'une mention contraire, les réactifs utilisés pour les expériences ont tous été achetés chez Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA), et les plastiques chez Sarstedt (Numbrecht, Germany).

I. Modèle animal

I. A. Animaux

Les animaux utilisés sont des souris C57/B16 mâles âgées de 6 à 8 semaines achetées aux laboratoires Janvier (Mayenne, France) et hébergées dans l'animalerie dépourvue de pathogène de l'institut Pasteur de Lille ou de la faculté de Médecine de Lille. Eau et nourriture leur sont fournies à volonté. Le sacrifice s'effectue par l'injection intra-péritonéale (IP) de 0,3ml de Pentobarbital sodique à 5,47%.

Des souris inactivées pour certains gènes sur un fond génétique C57/B16 ont également été utilisées. Ces souris nous ont été fournies par le Dr Ryffel (CNRS, UMR6218, F-45071 Orléans) et élevées dans les mêmes conditions. Il s'agit de souris :

- TLR₂^{-/-}
- NOD₁^{-/-}
- NOD₂^{-/-}
- TLR₂^{-/-} / NOD₁^{-/-}
- IL-1R^{-/-}
- NOD₁^{-/-} / TIRAP^{-/-}

I. B. Souches de bactérie et de levure

I. B. 1. *Pseudomonas aeruginosa*

La souche de référence est PaO1 (85), cultivé en phase liquide à partir du stock cryo-préserveré dans du milieu de Luria-Bertani (LB : tryptone 1% m/v, extrait de levure 0,5% m/v et NaCl 1% m/v), pendant 16h, à 37°C, sous agitation modérée, puis lavée et resuspendue dans du sérum salé isotonique (SSI : NaCl 9‰). La concentration bactérienne est mesuré par densité optique à 600 nm (DO600) (0,9 DO600 \approx 10⁹ unité formant colonie (CFU)/ml), et vérifiée par dilution et étalement sur boîtes Bromo-Cresol Purple agar (BCP, Bio Mérieux, Marcy l'étoile, France). Le dénombrement bactérien est réalisé après une incubation à 37°C pendant 24h.

I. B. 2. *Candida albicans*

La souche de référence est CaSC5314, et est cultivée pendant 24h à partir du stock cryo-préservé dans du milieu Yeast-Peptone-Dextrose (YPD : extrait de levure 1% m/v, peptone 2% m/v, dextrose 2% m/v), sous agitation modérée, lavée et resuspendue dans du SSI. La concentration de levures est déterminée par numération sur cellule de Malassez et vérifiée par numération des colonies sur gélose YPD (Milieu YPD, agar 2%, amikacine 0,0015%), après dilution en série et étalement, après 24h d'incubation à 37°C. La filamentation de *C. albicans* est déclenchée par l'incubation de 10⁶ unités formant colonie (CFU)/ml dans du milieu RPMI (Gibco) pendant 24h à 37°C. Si nécessaire, *C. albicans* est tué par immersion dans l'éthanol pur pendant 15 minutes, suivi de 5 à 7 lavages par du SSI.

I. B. 3. Autres microorganismes

Saccharomyces cerevisiae S288C (Pr. Fairhead, université Paris Sud) et *Schizosaccharomyces pombe* SP972 (Dr. Bernard, université Claude Bernard – Lyon I) ont également été utilisées et cultivées dans les mêmes conditions que *C. albicans*.

I. C. Modèle murin de pneumonie

I. C. 1. Colonisation & infection

Pour la colonisation et l'infection, les souris sont anesthésiées sur une courte période par l'inhalation de sevoflurane (Abbott, Chicago, IL, USA). L'instillation se fait alors par voie intranasale (IN) de 50µl de la solution préparée.

L'un des travaux préalables a été de mettre au point l'instillation intra-nasale. En effet, l'instillation endotrachéale était utilisée jusque là comme norme dans le laboratoire. La technique d'instillation intranasale a été apprise avec une anesthésie générale prolongée (injection IP d'un mélange kétamine-largactil) avec un volume d'instillation de 20µl. Mais après des tests, il est apparu que cette technique posait les mêmes techniques de reproductibilité que notre technique endotrachéale. Nous avons alors mis au point l'instillation intranasale avec un volume de 50µl avec une anesthésie de courte durée par sevoflurane. Comme le volume, la concentration et la voie d'instillation influent sur le modèle de pneumonie (17), nous avons comparé pour les souris BALB/c et les souris C57/Bl6 les instillations endotrachéale et IN. Le résultat est que la charge bactérienne pulmonaire, mais aussi l'évolution du modèle ne sont pas significativement différents entre les deux types d'instillations (1,8.10⁵±1,2.10⁵ CFU/g de poumon IT vs. 1,7.10⁵±3,3.10³ CFU/g de poumon

IN, $p = 0,21$ pour les BALB/c et $2,9.10^5 \pm 1,3.10^5$ CFU/g de poumon IT vs. $6,2.10^5 \pm 3,2.10^4$ CFU/g de poumon IN, $p = 0,21$ pour les C57/Bl6).

1^{ère} instillation : La colonisation des voies aériennes par *C. albicans* se fait par l'instillation IN de 50µl de SSI calibré pour contenir 10^5 CFU de *C. albicans*. Le groupe contrôle est instillé par du SSI dans les mêmes conditions. Pour l'utilisation de *S. cerevisiae* ou de *S. pombe*, l'instillation se fait dans les mêmes conditions et au même inoculum.

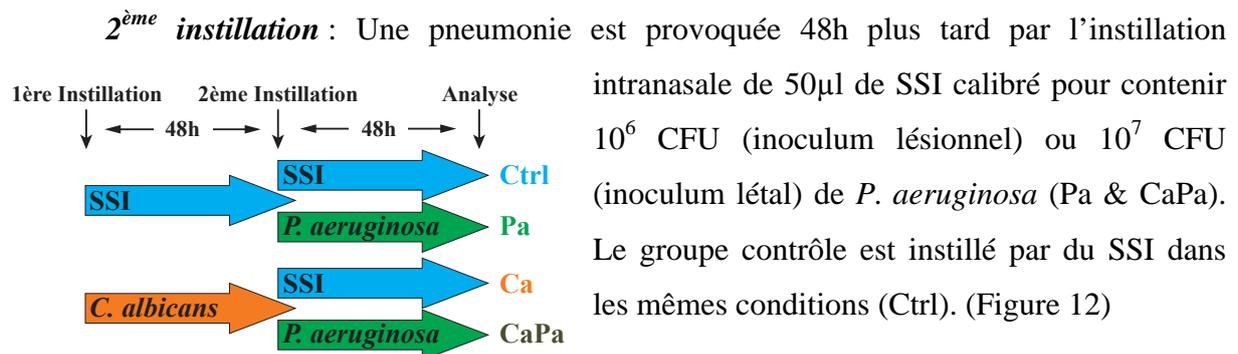


Figure 12. Groupes expérimentaux.

I. C. 2. Traitements pharmacologiques (cf. Tableau 2)

Neutropénie

Les souris ont été rendues neutropéniques par l'injection IP de cyclophosphamide à la dose de 75mg/Kg dans une solution de glucose à 5% 4 jours avant, 2 jours avant et le jour de la première instillation. Cette procédure entraînait une neutropénie la veille de la 2^{ème} instillation (125).

Anti-IL-22

Cinquante microgrammes d'un anticorps neutralisant anti-IL-22 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) était administré par voie endotrachéale immédiatement avant la 1^{ère} instillation (122). Pour la voie endotrachéale, les souris étaient anesthésiées par l'inhalation de sevoflurane (SevoraneTM Abbott, Chicago, IL, USA) puis placées en décubitus dorsal proclive avec un angle d'environ 30° par rapport à l'horizontale. La profondeur de l'anesthésie est objectivée par la fréquence et l'amplitude respiratoire. Une aiguille de 24 Gauge (Popper & Sons Inc., New Hyde Park, NY, USA) est introduite, via l'oropharynx. La position endotrachéale est confirmée par les mouvements de la solution dans la seringue, dus aux efforts respiratoires de l'animal. Le volume injecté est de 50µl.

Anti-CD90.2

Les anticorps anti-CD90.2 (BioXCell, West Lebanon, NH, USA) ont été injectés IP aux souris tous les 3 jours, 6 jours avant la 2^{ème} instillation à la dose de 250µg/souris/injection (126).

Anti-IL-17

Les anticorps polyclonaux anti-IL-17 (don de Catherine Uyttenhove, Université Catholique de Louvain, Belgique) ont été injectés IP aux souris deux fois par jour, à partir de la 1^{ère} instillation, à la dose de 50µg/souris/injection.

Anti-CCL20

Les anticorps monoclonaux anti-CCL20 ont été injectés IP aux souris juste avant la colonisation par *C. albicans* à la dose de 50mg/Kg.

IL-22 murine recombinante

Sept cent nanogrammes d'IL-22 murine recombinante (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) était instillée IN dans 50µl 48h et 24h avant l'instillation de SSI ou de *P. aeruginosa* (122).

Antagoniste du récepteur de l'IL-1β (Anakinra)

Les souris étaient traitées par l'anakinra, un antagoniste du récepteur de l'IL-1β (Amgen, Thousand Oaks, CA, USA), par injection IP de 10mg/Kg 48h et 24h avant la 2^{ème} instillation.

Clodronate

Les macrophages alvéolaires ont été déplétés grâce à l'injection de 100µl d'une solution à 5mg/ml de clodronate liposomal, par voie endotrachéale 72h avant la 1^{ère} injection, comme cela a déjà été décrit (127).

LPS

Lors du test de spécificité du modèle, la première instillation par *C. albicans* a été remplacée par l'instillation de 50µl d'une solution de LPS à 2mg/ml, par voie IN.

Traitement par des sucres de paroi de C. albicans

Lors de la première instillation, *C. albicans* a été remplacé par des sucres purifiés de paroi de *C. albicans* : mannanes, glucanes ou chitine (cf. III. A. 1. Extraction des sucres de paroi ci-dessous). Les sucres étaient resuspendus dans du SSI à une concentration correspondant au poids sec de $2 \cdot 10^7$ CFU/ml.

I. C. 3. Transfert de cellules immunitaires

Les poumons de souris sont récupérés 24h après la première instillation (2 groupes : Ca et Ctrl) et les cellules immunitaires en sont extraites, puis marquées et préparées pour la cytométrie en flux (cf. II. D. 1. α ci-dessous). Un tri est alors effectué par un trieur associé au cytomètre de flux (BD FACS ARIA) pour séparer les cellules NK (CD56+ ; NK1.1+) et les macrophages (F4/80+ ; CD11c+) des autres cellules. Les cellules NK et les macrophages sont alors resuspendus à la concentration de 10^7 cellules/ml. Des souris sont alors instillées par voie endotrachéale par 20 μ l de chaque suspension de cellule, et infectées 24h plus tard par 10^6 CFU de *P. aeruginosa*.

	H-96	H-72	H-48	H-24	H0: 1ère Instillation	H12	H24	H36	H48: 2ème Instillation
Modèle animal de base					C. albicans 105 CFU/ml OU SSI, 50µl IN				P. aeruginosa, 107 CFU/ml OU SSI, 50µl IN
Inhibition de la signalisation de l'IL-1β					Anakinra 10mg/Kg IP		Anakinra 10mg/Kg IP		
Inhibition de la signalisation de l'IL-17					aIL-17 50µg IP	aIL-17 50µg IP	aIL-17 50µg IP	aIL-17 50µg IP	aIL-17 50µg IP
Inhibition de la signalisation de l'IL-22					aIL-22 50µg IT				
Stimulation par l'IL-22					IL-22 0,7µg IN		IL-22 0,7µg IN		
Déplétion des ILC	aCD90.2 250µg IP			aCD90.2 250µg IP					aCD90.2 250µg IP
Déplétion des PNN	Cyclophosphamide 75 mg/Kg IP		Cyclophosphamide 75 mg/Kg IP		Cyclophosphamide de 75 mg/Kg IP				
Déplétion des macrophages alvéolaires		Clodronate, 100µl (5mg/ml) IT							
Stimulation par les composants de paroi de C. albicans					Mannanes ou Glucanes ou Chitine [C] ≈ poids sec de 2.106 CFU/ml de C. albicans				
Stimulation par du LPS					LPS 2mg/ml IN				
Inhibition de la signalisation de CCL20					aCCL20 50mg/Kg IP				

Tableau 2. Traitements administrés aux différents groupes de souris

II. Évaluation & recueil de résultats dans le modèle animal

II. A. Poids & survie

Les souris sont évaluées au moins toutes les 12h et pesées toutes les 24h partir de la première instillation ou de la première injection et jusqu'à leur sacrifice ou leur décès. Un pourcentage de variation pondérale est calculé à chaque fois par rapport au poids initial. Lors du décès d'une souris, son poids et l'heure de la constatation du décès sont rapportés.

II. B. Quantification des lésions pulmonaires : perméabilité de la barrière alvéolo-capillaire

Elle est évaluée par la mesure du passage alvéolo-interstitiel d'albumine marquée à la Fluoresceine Iso-ThioCyanate (FITC). Avant le sacrifice, l'albumine-FITC est injectée en IP aux souris. Après sacrifice, elles sont exsanguinées; les poumons sont prélevés et homogénéisés. L'homogénat de poumon et le sang collectés sont alors centrifugés, chacun des surnageant est prélevé et la fluorescence mesurée. (Excitation: 487nm, Emission: 520nm ; Mithras LB 940, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany). La fluorescence pulmonaire mesurée est proportionnelle à la concentration de l'albumine-FITC dans le sang et au degré de lésion de la barrière alvéolo-capillaire (26).

II. C. Analyse bactérienne et fongique

II. C. 1. Charges bactérienne et fongique pulmonaires

Quarante huit heure après la deuxième instillation, les poumons sont prélevés et homogénéisés. Les micro-organismes viables sont comptés après étalement de dilutions en série sur gélose BCP et YPD, et incubation pendant 24h à 37°C.

II. C. 2. Translocation bactérienne et fongique

La rate des animaux est prélevée après sacrifice, homogénéisée et étalée sur gélose BCP ou YPD. Les géloses sont incubées pendant 24h à 37°C. Cette translocation est rapportée comme présente (1 ou plusieurs CFU) ou absente (Aucune CFU).

II. D. Caractérisation de la réponse immune

II. D. 1. Caractérisation cellulaire

II. D. 1. α . LBA et récupération des poumons

Après sacrifice de la souris est exsanguinée par section de l'artère fémorale et des troncs brachio-céphaliques. Une canule de 21G est alors introduit via l'oropharynx dans la trachée. L'étanchéité est assurée par une ligature de la trachée autour de la canule par un fil. 2ml de solution saline tamponnée par du phosphate (PBS) à 4°C sont injectés dans les poumons en 4 fois, et récupérés. L'injection intracardiaque de 3 à 5ml de PBS glacé permet d'éliminer le sang intravasculaire des poumons. Les poumons sont excisés. Deux lobes sont placés dans 1ml de PBS à 4°C pour extraction et analyse des cellules, un lobe est homogénéisé dans 1ml de SSI à 4°C pour analyse de la charge bactérienne pulmonaire, et un lobe est congelé dans l'azote liquide pour permettre l'extraction ultérieure d'acides nucléiques.

II. D. 1. β . Extraction des cellules.

Le poumon est homogénéisé de façon mécanique puis chimique par incubation pendant 30min à 37°C dans de la collagénase à 10% dans du RPMI. La solution obtenue est filtrée puis resuspendue dans une solution de Percoll à 20% et centrifugée 20 minutes à 1500g pour séparer les cellules immunitaires des débris. Les hématies sont alors lysées par un choc osmotique puis les cellules sont reprises dans 1ml de PBS avec 2% de sérum de veau fœtal v/v (PBS-SVF). Le surnageant du LBA est séparée des cellules par centrifugation douce (1000G, 10minutes), aliquoté et congelé à -80°C. Les cellules sont resuspendues dans 1ml de PBS-SVF. Les cellules sont alors comptées sur un hématimètre.

II. D. 1. γ . Analyse des cellules par cytométrie en flux

Différents mix d'anticorps sont préparés en fonction des cellules d'intérêt (*cf.* Tableau 2), ainsi qu'un mix d'isotypes marqués (Anticorps BD, Franklin lakes, NJ, USA) . Les cellules sont incubées avec les mix pendant 30 minutes à 4°C, dans le noir puis lavées 2 fois et resuspendues dans 300 μ l de PBS-SVF. Le marquage intracellulaire des cytokines par des anticorps anti-IL-17, anti IL-22 ou des isotype a été fait en suivant les consignes du kit e-bioscience (San Diego, CA, USA). Les cellules marquées sont ensuite analysées sur un cytomètre BD LSR Fortessa. Les données ont ensuite été traitées grâce au logiciel FlowJo (Treestar, Stanford, CA, USA)

Fluorochrome	Extracellulaire		Intracellulaire	
	Cellules présentatrices d'antigène	Lymphocytes	Cellules lymphoïdes innées	Lymphocytes
FITC	lab	CD5	Lineage	
PE	F4/80	CD1.d	IL-22	IL-22
PerCP/Cy5	CD103	NK1.1	NK1.1	NK1.1
PE Cy7	CD11c		CD127	
APC	CCR2	CD25	IL-17	IL-17
Alexa 700	CD86	CD69	CD90.2	
APC H7	LY6G	CD4	CD4	CD4
V450	CD11b	TCRb		TCRb
V500	CD45	CD8		CD8
ef605	Ly6C	CD45	CD45	CD45

Tableau 3. Mix d'anticorps en fonction des cellules d'intérêt.

II. D. 2. Dosage des cytokines dans le surnageant de LBA

Les cytokines sont dosées dans le surnageant de LBA par ELISA, en suivant les instructions fournies par le fabricant (R&D, Minneapolis, MN, USA).

II. D. 3. Dosage des défensines par RT-qPCR

L'extraction d'ARN après homogénéisation du poumon a été effectuée grâce au kit de purification GeneJETTM de Fermentas (Glen Burnie, MD, USA). L'ARN a ensuite été rétro-transcrit grâce au kit de rétrotranscription "Agilent AffinityScript Multiple Temperature cDNA Synthesis Kit" (Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA). La PCR quantitative (qPCR) est effectuée grâce au kit Agilent "Brilliant II SYBR[®] Green qPCR Master Mix" Sur un thermocycleur Stratagene MX 3005p d'Agilent. Le cycle seuil est enregistré pour chaque gène dans chaque condition (CT). Après amplification, la courbe de température de dissociation de l'ADN est évaluée pour vérifier la présence d'un seul amplicon. Le gène de la β -actine a été utilisé comme référence interne pour normaliser l'expression génique. Soit ΔCT la différence de CT entre l'actine et le gène d'intérêt pour un même échantillon. Soit $m\Delta Ct$ la moyenne des ΔCT calculés pour le groupe contrôle. Le niveau d'expression d'ARNm ont été

déterminés par la formule suivante : $\Delta\Delta CT = [\Delta CT \text{ du gène d'intérêt} - m\Delta CT \text{ du gène d'intérêt}]^2$. Les amorces utilisées sont détaillées dans le tableau 4.

	Forward	Reverse
β-Actine	GAATGGGTCAGAAGGACTCCTATG	CCATGTCGTCCAGTTGGTAA
mBd1	TCCTGGTGATGATATGTTTTCTTTCT	TGTTCTTCGTCCAAGACTTGTGA
mBd2	AAAGTATTGGATACGAAGCAGAACTTG	GGAGGACAAATGGCTCTGACA
mBd3	TGAGGAAAGGAGGCAGATGCT	GGA ACTCCACA ACTGCCAATC
mBd4	AACATGCATGACCAATGGAG	TCATCTTGCTGGTTCTTCATCT
LL-37	CAGAGCGGCAGCTACCTGAG	TCACCACCCCCTGTTCCCTT

Tableau 4. Amorces utilisées pour la qPCR

III. *In vitro*

III. A. Extraction des composants de la paroi de *C. albicans*

Cette extraction se fait à partir d'une pâte de culture de *Candida albicans* séparée et lavée de son surnageant par centrifugations successives.

III. A. 1. Extraction des mannanes

Cent grammes de la pâte de *C. albicans* sont lavés dans du tampon citrate à 0,2M et autoclavés à 125°C dans du tampon citrate 0,2M deux fois de suite. Le surnageant est à chaque fois prélevé. Les mannanes en sont extraites par précipitation dans la liqueur de Fehling, puis dissoutes dans l'acide chlorhydrique à 3M et enfin reprecipitées dans un mélange d'acide acétique et de Méthanol (8:1 v/v). Les mannanes ainsi obtenus sont resuspendus dans de l'eau et l'étape d'extraction est répétée à partir de l'étape de la liqueur de Fehling, pour éliminer les β -glucanes (128).

III. A. 2. Extraction des β -glucanes

La pâte restant après extraction des mannanes est bouillie pendant 30 minutes dans de la potasse à 1M. Le surnageant est mis de côté : il contient les β -glucanes (129).

III. A. 3. Extraction de la chitine

Le culot récupéré par centrifugation après passage dans la potasse est resuspendu dans une solution d'acide acétique glacial à 40% (v/v) d'H₂O₂, et autoclavée à 125°C. Le culot est ensuite bouilli pendant 30 minutes dans de la potasse à 1M, deux fois de suite, avec, entre les 2 cinq lavages par de l'eau déminéralisée. Après lavage, la chitine est resuspendue dans de l'eau déminéralisée (129).

III. B. Stimulation cellulaire *in vitro*

Les cellules isolées des poumons de souris, mais sans LBA préalable (*cf.* II. D. 1. β . ci-dessus) sont resuspendues à une concentration finale de 10⁶ cellules/ml dans du DMEM (Dulbecos's Modified Eagle's Minimum Essential Media : CaCl₂ 256 mg/l, KCl 400 mg/l, MgSO₄ 200 mg/l, NaCl 5800 mg/l NaHCO₃ 2200 mg/l NaH₂PO₄ 140 mg/l, Glucose 1000 mg/l, HEPES 5957,40 mg/l, rouge de phénol 10 mg/l, Arginine 126,40 mg/l, Cystéine 24 mg/l, Histidine 42 mg/l, isoleucine 52,40 mg/l, leucine 52,40 mg/l, lysine 73 mg/l, méthionine 15 mg/l, phénylalanine 33 mg/l ; Life technologies, Carlsbad, CA, USA), complété avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté et 1% de L-glutamine. Cette suspension est répartie dans une plaque 96puits (50 μ l soit 5.10⁴ cellule/puits). 50 μ l de solution dans chacun des puits (5.10⁴ cellule/puits) et les cellules sont mises à incuber à 37°C dans une étuve à 5% CO₂.

Sont alors ajoutés 50 μ l d'une solution de DMEM contenant, selon les groupes 5.10⁴ CFU de *P. aeruginosa* (Multiplicity Of Infection ou MOI :1) ou 5.10⁵ cellules de *C. albicans* tuées par de l'éthanol (MOI :10). Du milieu seul est ajouté pour les groupes contrôle. Les cellules sont laissées à incuber pendant 24h à 37°C à 5% de CO₂. Le surnageant de culture est alors collecté après centrifugation (100g, 10min) et congelé pour permettre l'analyse des cytokines du surnageant par ELISA. Chaque condition est faite en duplicata.

IV. Analyses statistiques

Les variables quantitatives ont été analysées par analyse univoque de la variance (ANOVA), avec un test post hoc U de Mann & Whitney lorsque cela était approprié. La survie a été analysée en utilisant un test du Log-Rank. Les variables qualitatives ont été analysées par un test du χ^2 . La construction des graphes et l'analyse des résultats a été faite grâce au logiciel GraphPad Prism 6[®] (GrapPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Les

résultats sont exprimés en moyenne \pm écart standard à la moyenne. Un $p < 0,05$ est considéré comme significatif.

RÉSULTATS

RÉSULTATS

I. Validation du modèle dans le fond C57BL/6

Les expériences réalisées par Florence Ader (3) lors de la mise au point du modèle utilisaient une souche de souris BALB/c. Lorsque nous avons voulu explorer le mécanisme protecteur induit par *P. aeruginosa*, nous avons envisagé l'utilisation de souris génétiquement modifiées pour perdre l'expression d'un gène d'intérêt. La plupart des souches de souris utilisées dans le champ de l'immunologie et de l'infectiologie sont dérivées de la souche C57BL6. Nous avons donc vérifié que la colonisation des voies aériennes par *C. albicans* permettait une protection contre les lésions induites au cours de la pneumonie à *P. aeruginosa* en comparant les fonds BALB/c et C57BL/6. La colonisation en elle-même n'est pas pathogène, avec une lésion pulmonaire et une variation pondérale non significativement différente entre les contrôles et les souris colonisées, dans les deux fonds génétiques (Figure 13A & B). Cette colonisation protège les souris au cours de la pneumonie, avec une diminution significative de la perte de poids, de la lésion pulmonaire et de la charge bactérienne pulmonaire, dans les deux fonds génétiques (Figures 13A, B & C).

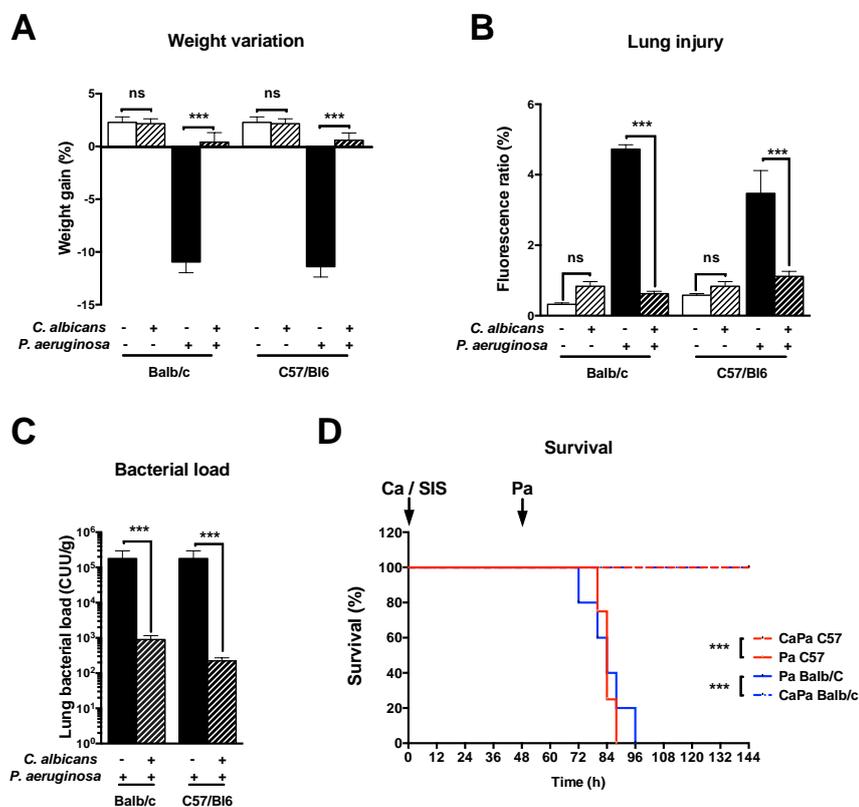


Figure 13. Evaluation du modèle dans les fonds génétiques BALB/c et C57BL/6. En utilisant un inoculum de *P. aeruginosa* non létal. Evaluation de A. la variation pondérale, B. la lésion pulmonaire et C. la charge bactérienne pulmonaire. En utilisant un inoculum létal D. évaluation de la survie.

Dans le modèle initial (3), l'inoculum de *P. aeruginosa* était un modèle non létal. L'utilisation d'un modèle létal permet de mettre en évidence des mécanismes qui ont une relevance clinique beaucoup plus grande, car le critère de jugement est la survie des souris. En augmentant l'inoculum de *P. aeruginosa* (10^7 CFU/souris), la pneumonie est mortelle dans $\approx 100\%$ des cas (la mortalité n'était que de 4 animaux sur 5 dans certaines expériences, mais avec une fréquence inférieure à 1/5) dans les deux fonds génétiques. La colonisation des voies aériennes par *C. albicans* permet une réduction de cette mortalité, avec une survie dans $\approx 100\%$ des cas (Figure 13D).

II. Voies de signalisation impliquées dans la réponse protectrice

La première hypothèse évoquée pour l'effet protecteur était celle d'une activation des voies de signalisation cellulaire par *C. albicans*, "préparant" les cellules effectrices pour une activation plus rapide et plus efficace lors de la pneumonie. Parmi les voies de signalisations, deux sont communes entre *P. aeruginosa* et *C. albicans*, la voie MYD88/NF κ B et la voie de l'inflammasome.

La voie de l'inflammasome nécessite 2 signaux pour être activé. Le premier est dépendant de MYD88/NF κ B et permet la synthèse de pro-IL-1 β . Le 2^{ème} est indépendant de NF κ B et aboutit à l'activation de la caspase I, elle-même responsable d'une conversion de la pro-IL-1 β en IL-1 β inactive. La sécrétion d'IL-1 β a été montrée comme étant importante dans la réponse immunitaire contre *C. albicans* (77) et *P. aeruginosa* (130). Nous avons donc décidé de rechercher une perte de la protection conférée par *C. albicans* dans le modèle létal en utilisant des souris déficientes pour le récepteur à l'IL-1 β ou des souris traitées par l'anakinra, un inhibiteur compétitif du récepteur à l'IL-1. Mais la colonisation des voies aériennes par *C. albicans* continuait à protéger les souris contre les lésions induites par la pneumonie, même en l'absence de signalisation fonctionnelle par l'IL-1 β (Figure 14A).

Les TLR reconnaissent les PAMP et entraînent, par l'intermédiaire de MYD88, une activation de NF κ B, et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires. TLR2 a une spécificité de reconnaissance large, et peut être activé à la fois par *C. albicans* et *P. aeruginosa* (131). Par ailleurs, NOD1 (Nacht Oligomerization Domain) reconnaît le LPS intracellulaire de *P. aeruginosa*, et active lui aussi la voie NF κ B. Nous avons recherché une perte de protection dans le modèle létal en utilisant des souris déficientes pour TLR2, NOD1 ou les deux. Mais la colonisation des voies aériennes par *C. albicans* continuait à protéger les souris contre les

lésions induites par la pneumonie, même en l'absence de signalisation fonctionnelle de TLR2 (Figure 14B). Ces résultats ont également été reproduits en utilisant des souris déficientes pour TIRAP (Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain containing adaptor protein), l'adaptateur signalant en aval de TLR2 & TLR4, dans un modèle non léthal (Données non montrées).

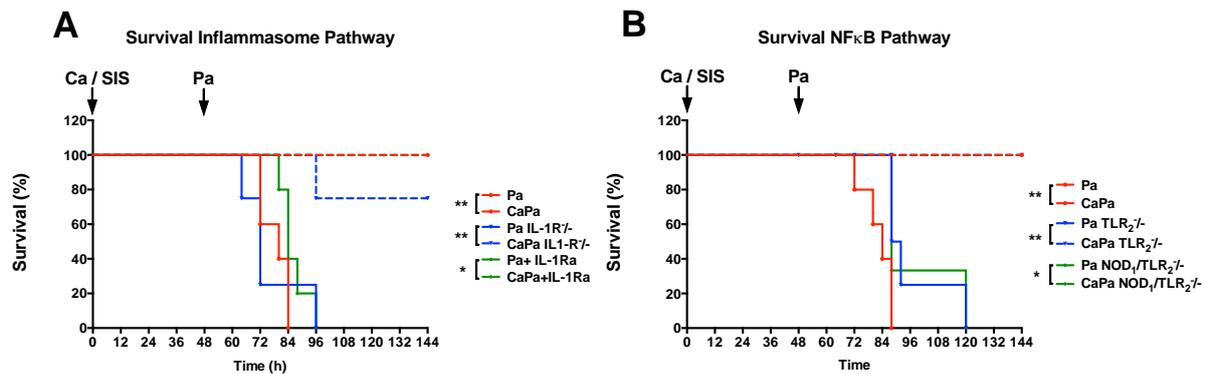


Figure 14 : Evaluation des voies de l'IL-1 β et NF κ B. Recherche d'une perte de l'effet protecteur conféré par *C. albicans* dans le modèle léthal. A. lorsque la signalisation de l'IL-1 est inhibée **B.** Lorsque la signalisation en amont de NF κ B est inactivée.

Du fait des probables redondances dans les voies de signalisation des PRR, et de l'augmentation de la sensibilité des souris à *P. aeruginosa* lorsqu'un grand nombre de récepteurs étaient inactivé, nous avons décidé d'explorer les voies effectrices de la réponse induite par *C. albicans*, afin de déterminer quelles cytokines, quelles cellules et quels autres effecteurs étaient responsable de la protection.

III. Réponse cellulaire et cytokinique induite par *C. albicans*.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Infection & Immunity* en Janvier 2014 (*Infect Immun.* 2014 Jan;82(1):306-15. doi: 10.1128/IAI.01085-13. Epub 2013 Oct 28.)

L'article a été retiré pour les besoins de la diffusion en ligne.

IV. CCL20

Après avoir mis en évidence le recrutement des ILC au poumon et leur rôle dans la réponse immunitaire induite par *C. albicans*, nous avons évalué la possibilité de recruter les ILC indépendamment de *C. albicans*. Il a été rapporté que les ILC expriment le chemokine receptor 6 (CCR6) (132) et pouvaient en conséquence répondre au ligand de CCR6, chemokine ligand 20 (CCL20), une chémokine capable d'induire le recrutement des lymphocytes et dotée d'une activité antimicrobienne propre, du fait d'une parenté de structure avec les β -défensines (121).

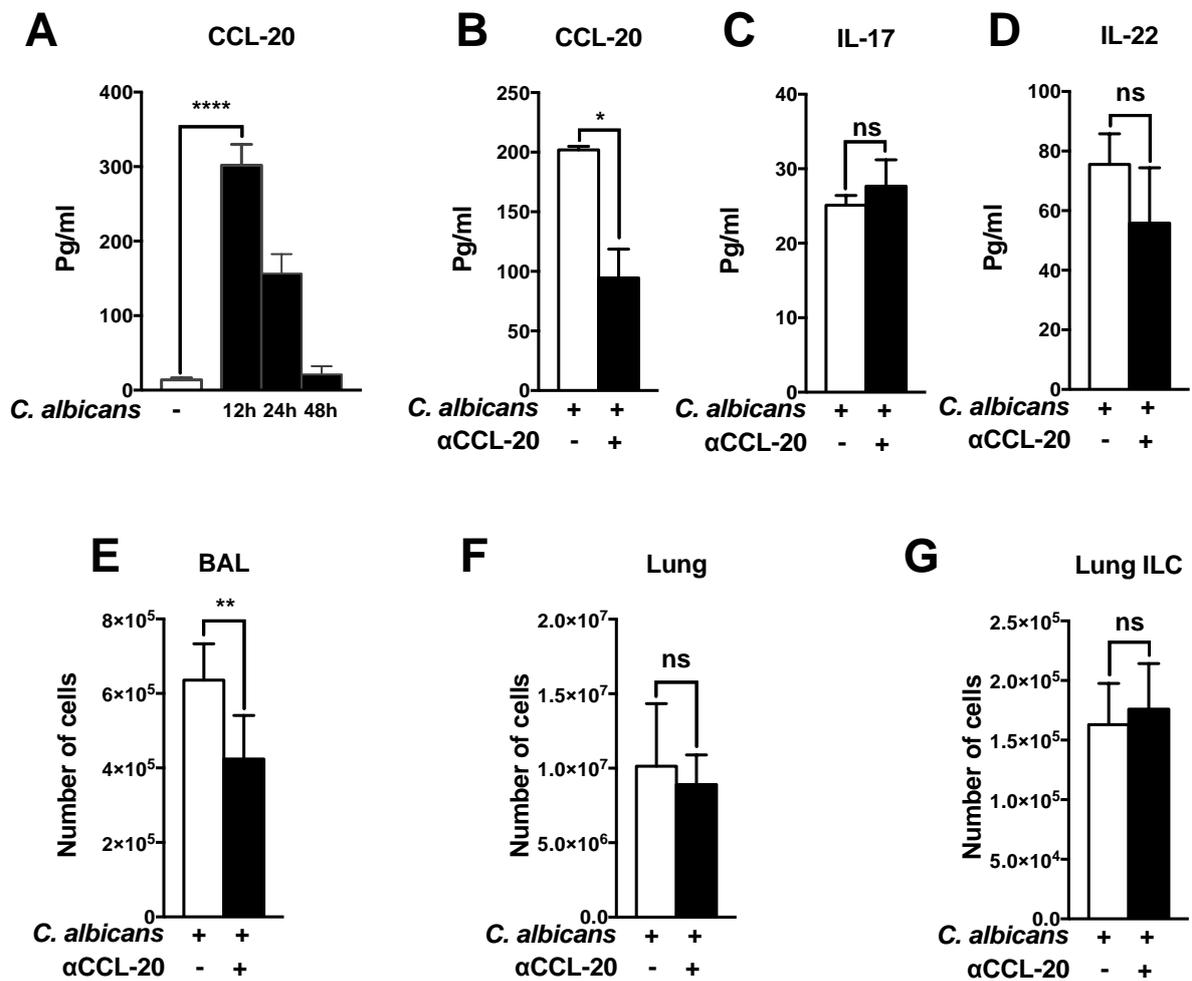


Figure 15. Rôle de CCL20 dans le recrutement des ILC. A. Dosage de CCL20 dans le BAL de souris contrôle et 12, 24 et 48h après colonisation par *C. albicans*. Les souris ont ensuite été traitées par un anticorps anti-CCL20. B. CCL20, C. L'IL-17 et D. L'IL-22 ont alors été dosées dans le LBA. La cellularité a ensuite été analysée pour les mêmes groupes dans E. le LBA et F. le poumon. Enfin, G. le recrutement des ILC au poumon a été mesuré.

Nous avons dosé CCL20 par ELISA dans le surnageant de LBA chez des souris contrôle et des souris colonisées par *C. albicans*, 12, 24 et 48h après la colonisation. La

colonisation des voies aériennes est responsable d'une augmentation significative de CCL20 dans le liquide de LBA dès 12h après la colonisation ($13,9 \pm 2,6 \text{ pg/ml}$ vs. $301,9 \pm 27,9 \text{ pg/ml}$, $p < 0,0001$). CCL20 diminue ensuite pour revenir au niveau du contrôle 48h après la colonisation. (Figure 15A).

Le traitement des souris par un anticorps anti-CCL20 permet de diminuer de façon significative la quantité de CCL20 dans le surnageant de LBA ($94,5 \text{ pg/ml} \pm 24,1$ pour les souris traitées vs. $201,9 \pm 3 \text{ pg/ml}$ pour les souris non traitées, $p = 0,0283$, Figure 15B). En revanche, cela n'affecte pas la quantité d'IL-17 et d'IL-22 dans le LBA (Figure 15 C & D). Ce traitement par un anti-CCL20 diminue de façon significative le nombre de cellules recrutées dans le LBA ($4,2 \cdot 10^5 \pm 4,8 \cdot 10^4$ cellules pour les souris traitées vs. $6,4 \cdot 10^5 \pm 4 \cdot 10^4$ cellules pour les souris non traitées, $p = 0,0087$, Figure 15E). Mais le nombre de cellules recrutées dans le poumon et le nombre d'ILC n'est pas significativement différent entre les deux groupes (Figure 15F & G)

Nous n'avons donc pas réussi à mettre en évidence de cytokine ou de chémokine induite par *C. albicans* permettant de recruter les ILC.

V. Utilisation des polysides pariétaux de *C. albicans*.

Afin d'étendre le champ d'application de la protection par *C. albicans*, nous avons essayé de le remplacer par des composés dépourvus de pouvoir pathogène. Comme cela a été montré plus haut, *C. albicans* mort est capable de protéger les souris, mais à une dose 100 fois supérieure à celle utilisée lorsqu'il est vivant. Les principaux PAMPs de *C. albicans* sont des composants de sa paroi. Nous avons donc purifié les différents composants de la paroi de *C. albicans* (Chitine, glucanes et mannanes) en utilisant une méthode décrite précédemment (128). Nous avons ensuite instillé aux souris des solutions contenant les sucres à la dose de 10mg/ml et avons analysé la lésion pulmonaire et la charge bactérienne pulmonaire 48h après infection par *P. aeruginosa*.

Les souris instillées par les mannanes sont toutes mortes dans les 48h qui ont suivi l'instillation de *P. aeruginosa*. Les β -glucanes sont les seules capables de diminuer à la fois la charge bactérienne et la lésion pulmonaire. Mais il existe une discordance, car la perte de poids des souris n'est pas significativement différente de celle des souris infectées par *P. aeruginosa* (Figure 16 A-C).

Par ailleurs, il apparaît que les techniques de purification utilisées ne sont pas suffisamment performantes pour garantir un produit suffisamment pur et débarrassé des solvants de purification. L'utilisation des sucres fera donc l'objet d'un prochain travail.

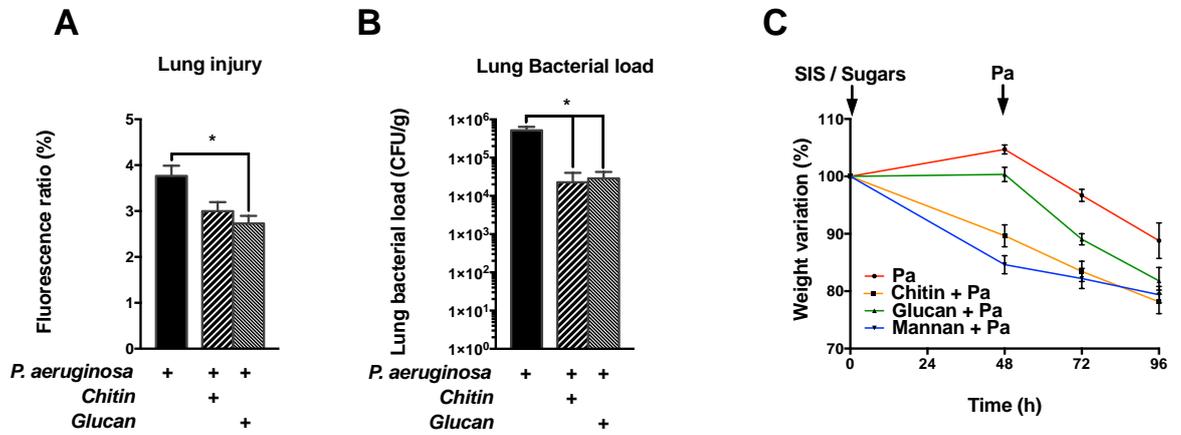


Figure 16 : Evaluation de l'activité des polysides pariétaux de *C. albicans* dans la protection au cours des pneumonies. Instillation de polysides purifiés suivi de l'instillation 48h plus tard de *P. aeruginosa*. Evaluation 48h après le début de la pneumonie de **A.** la lésion pulmonaire, **B.** La charge bactérienne pulmonaire et **C.** La variation pondérale.

DISCUSSION

Depuis la découverte de la vaccination, l'immunothérapie s'est voulue le plus souvent spécifique. Cependant, cette approche spécifique se heurte à la grande diversité des antigènes, notamment bactériens, et à leur immunogénicité variable. L'approche vaccinale ne s'applique pas à tous les agents infectieux. Les antibiotiques complètent la vaccination et permettent de traiter les infections pour lesquelles aucun vaccin n'est disponible. Mais la plasticité du génome bactérien a permis une évolution rapide et le développement de résistances, rendant nécessaire de nouvelles approches thérapeutiques.

La stimulation de l'immunité innée pour limiter la sévérité des infections virales, fongiques et bactériennes est une stratégie qui a déjà été décrite et explorée dans les modèles animaux (133-135). De plus, la manipulation du système immunitaire inné s'avère plus délicate qu'il ne le semblait au premier abord. Cette réponse met en jeu de nombreux mécanismes régulateurs peu connus pour le moment. La protection induite par *C. albicans* au cours des pneumonies à *P. aeruginosa* a été découverte de façon fortuite (3). L'hypothèse principale était que des interactions directes entre ces deux pathogènes était responsable de ce phénomène, notamment via une adhésion ou un QS trans-règne. Cette hypothèse a été invalidée en utilisant des mutants de *C. albicans* sur lesquels l'adhésion de *P. aeruginosa* était impossible ou ne produisant pas de QS (données personnelles non publiées, ayant fait l'objet d'un mémoire de master II).

L'observation d'un recrutement cellulaire au niveau du poumon et des alvéoles pulmonaires lors de la colonisation des voies aériennes par *C. albicans* a permis d'émettre l'hypothèse d'une stimulation de l'immunité innée. Nous avons alors décidé d'explorer la réponse immunitaire induite par *C. albicans* afin de déterminer quels facteurs étaient responsables de la protection observée.

C. albicans et *P. aeruginosa* ont en commun d'être opportunistes, majoritairement extracellulaires (47,136) et d'induire une réponse de type T_H17 (37,137). Cette réponse est secondaire à la stimulation des PRR extracellulaires par les différents PAMPs portés à la surface de ces micro-organismes, et à l'activation de la voie NF κ B grâce à l'adaptateur MYD88 (138). Il a déjà été montré que la stimulation d'un ou plusieurs PRR (TLR5, TLR2 ou TLR4) permettait de diminuer la mortalité des souris dans des modèles de pneumonie à pneumocoque (133,139) ou à *P. aeruginosa* (140,141). Par ailleurs, si la délétion isolée de TLR5 accroît la sévérité des pneumonies à *P. aeruginosa* (119), celle de TLR2 n'est pas responsable d'une susceptibilité accrue des souris au cours des pneumonies à *P. aeruginosa*

(119). De plus, la stimulation de TLR2 est un des facteurs permettant une réponse protectrice au niveau pulmonaire (141). TLR2 a enfin la particularité de pouvoir reconnaître à la fois des PAMPs fongiques et bactériens (141). Nous avons donc testé l'effet de la délétion de TLR2 et de TIRAP (adaptateur de TLR2 et TLR4) dans notre modèle, afin de déterminer si la stimulation de l'un ou de plusieurs de ces récepteurs était responsable de l'effet protecteur observé. Mais cette délétion n'a pas permis de faire disparaître l'effet protecteur. La délétion des PRR paraît difficile à mettre en œuvre, du fait du grand nombre de PRR stimulés par *C. albicans* et *P. aeruginosa* (37,142). En effet, il existe une redondance entre certains PRR, et des voies de signalisation communes qui permettent à l'immunité innée de déclencher une réponse, même en l'absence d'un ou de deux PRR. Ainsi, les déficits immunitaires liés au déficit d'un ou de plusieurs PRR sont rares et souvent le fait de déficit d'adaptateurs de PRR plus que des déficits de PRR, à l'exception notamment de Dectin1 (70). Ces déficits sont de plus surtout symptomatique dans l'enfance pour se corriger à l'âge adulte (143). De plus, certaines voies moléculaires ne sont pas activées seulement par la présence de l'antigène, mais également par son état. L'exemple le plus frappant étant l'activation de la voie MAP-kinase/c-fos par la filamentation de *C. albicans* (144). Sans savoir quels antigènes étaient nécessaires à la réponse protectrice, nous nous sommes tournés vers d'autres moyens d'explorer cette réponse.

L'autre voie commune mise en évidence pour *P. aeruginosa* et *C. albicans* est celle des inflammasomes (77,130,145). La voie de l'inflammasome est une voie intracellulaire activée lors d'un signal de "danger" (souvent une brèche membranaire), aboutissant à la sécrétion d'IL-1 β active. L'IL-1 β active est nécessaire à la mise en place d'une réponse T_H17 efficace (146,147). Nous avons donc bloqué l'action de l'IL-1 β , en utilisant un inhibiteur du récepteur à l'IL-1, l'anakinra ou en utilisant des souris dépourvues du récepteur à l'IL-1. Mais dans les deux modèles, la protection induite par *C. albicans* persistait malgré l'absence de signalisation par l'IL-1. Ce résultat est d'autant plus surprenant que la réponse induite par *C. albicans* vivant, et donc capable d'entraîner un signal de danger, est protectrice, alors que l'utilisation de *C. albicans* mort ou de levures moins pathogènes est responsable d'une réponse moins forte. Ces résultats sont discordants avec ceux de la littérature car l'activation de l'inflammasome, la sécrétion d'IL-1 β et d'IL-17 ont été décrits au cours des infections à *C. albicans*, notamment lors du passage de la colonisation à l'infection (78). Cependant à la dose administrée, *C. albicans* n'induit pas d'IL-17, contrairement à ce que nous observons en utilisant des doses infectantes de *C. albicans* en inhalation (données non montrées). Par

ailleurs, cette voie induit la production d'IL-18 (une cytokine dont l'action contrebalance celle de l'IL-1 β et également activée par l'inflammasome), dont le rôle dans la réponse à *C. albicans* n'est pas évalué.

Devant la probable redondance des systèmes de défense mis en jeu, et l'inefficacité du blocage de la voie de l'inflammasome, nous nous sommes intéressés aux cellules recrutées lors de la colonisation par *C. albicans*. Les polynucléaires neutrophiles sont les premières cellules recrutées, dès 12h après le début de la colonisation, mais vont diminuer progressivement dans les 48 premières heures. En revanche, les cellules NK et les macrophages vont être activés rapidement et rester augmentés durablement, comme nous avons pu l'observer en faisant une analyse de cinétique. Le rôle des macrophages a été montré au cours de la réponse innée dirigée contre *Candida* (148,149) et *P. aeruginosa* (150). En revanche, si les cellules NK sont importantes dans la réponse contre *P. aeruginosa* (151), la littérature ne met pas en évidence de rôle dans la réponse contre *C. albicans*. Nous avons supposé que les macrophages ou les cellules NK étaient les cellules responsables de l'effet protecteur observé. Après avoir vérifié que la déplétion des macrophages par le clodronate était bien responsable d'une augmentation de sensibilité de *P. aeruginosa* et d'une perte de l'effet protecteur vis à vis de *C. albicans*, nous avons effectué un transfert de macrophages ou de cellules NK activés *in vivo* puis triées par cytométrie en flux dans les poumons de souris naïves, avant de les infecter par *P. aeruginosa*. Mais ce transfert n'a pas permis de transférer la protection.

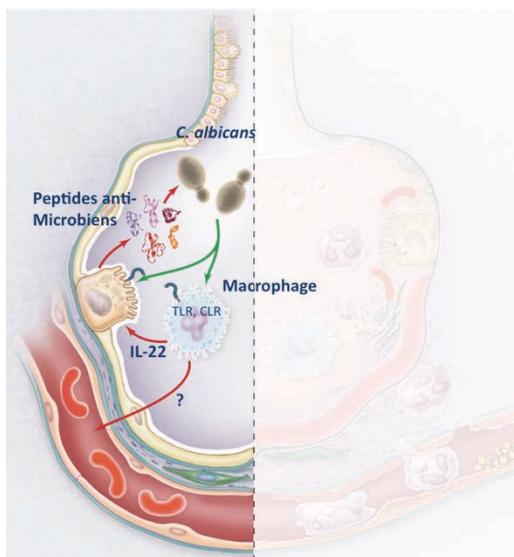
Les neutrophiles étant les effecteurs finaux indispensables pour la clairance bactérienne au cours des pneumonies à *P. aeruginosa* (117), nous avons répété le modèle chez des souris neutropéniques. Les neutrophiles sont effectivement indispensables à la clairance bactérienne et à la survie des souris. Mais si l'on diminue l'inoculum de 2Log₁₀, *C. albicans* permet tout de même d'induire une protection. Une partie de la protection est donc indépendante du recrutement des PNN.

Nous nous sommes alors intéressés au système de réponse induit par la colonisation des voies aériennes par *C. albicans*. Trois grands types de réponse ont été décrits : T_H1, impliqué principalement dans les infections virales et à bactéries intracellulaire, T_H2, impliqué dans la réponse allergique et antiparasitaire et T_H17, impliqué dans la réponse contre les bactéries extracellulaires et les fungi, notamment au niveau muqueux (152). Ces réponses sont caractérisées par des profils de sécrétion cytokinique spécifiques (153) et ont au départ été identifiées dans la réponse immunitaire adaptative, comme la polarisation de lymphocytes

T CD4. Mais il a été montré qu'il existait des sources innées de ces cytokines, capables d'assurer "l'intérim" en attendant que puisse se monter une réponse adaptative (154,155).

Dans le contexte, nous avons montré qu'au niveau pulmonaire, la seule cytokine qui soit constamment élevée après la colonisation par *C. albicans*, était l'IL-22, une cytokine apparentée à la voie T_H17. L'absence d'élévation de l'IL-17 était surprenante car il existe une littérature abondante reliant cette cytokine à la réponse induite par *C. albicans* (74,156) et des candidoses cutanéomuqueuse chroniques en cas de déficit en IL-17 (69). Les conditions particulières propres à notre modèle (organe cible et charge fongique) peuvent expliquer ce résultat. Cependant l'IL-22 a récemment été identifiée comme une cytokine également importante dans la réponse muqueuse contre *C. albicans* (72).

L'IL-22 est une cytokine de la famille de l'IL-10 qui a la particularité d'être sécrétée par les cellules de la lignée hématopoïétique, mais dont le récepteur n'est exprimé que sur des cellules d'origine non hématopoïétique (59). Son action principale est la résistance épithéliale à l'infection. La fixation de l'IL-22 à son récepteur induit l'activation de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire, l'adhésion, la prolifération cellulaire et la synthèse de chimiokines (59). Elle permet le remodelage épithélial et promeut la synthèse de peptides antimicrobiens (α - et β -défensine, cathelicidine) au niveau muqueux (59). L'IL-22 a un rôle



protecteur au cours des candidoses, comme cela a été démontré par de Luca *et al.* (72), les souris déficientes pour l'IL-22 étant plus susceptibles à *C. albicans* que les souris wild type. Mais l'IL-22 a également un rôle au cours des pneumonies à Bacilles Gram – avec une charge bactérienne pulmonaire plus importante et une survie moins longue pour les souris déficientes pour l'IL-22 (122) (Figure 17).

Figure 17 : Modèle de la réponse induite par *C. albicans*. Adapté de (14)

Lors de l'infection par *P. aeruginosa*, les cytokines augmentées sont l'IL-17, l'IL-22, le TNF α , l'IL-1 β et l'IL-6. La colonisation préalable des voies aérienne change le profil de sécrétion avec une augmentation de l'IL-17, de l'IL-22, de l'IL-23 et du TNF α et une diminution de l'IL-1 β . Ces résultats rejoignent ceux de la littérature pour ce qui est de la

réponse T_H17-like (IL-17, IL-22, IL-23). En effet, cette réponse est importante au cours des pneumonies bactériennes (157,158) et notamment des pneumonies à *P. aeruginosa* (137), via le recrutement des PNN sur le lieu de l'infection. Priebe *et al.* (159) ont également montré que l'IL-17 était importante dans la réponse vaccinale contre *P. aeruginosa* dans un modèle murin de pneumonie (Figure 18). La diminution de l'IL-1 β était surprenante, mais a été confirmée plus tard par le travail de thèse d'Emmanuel Faure (160). En effet, il montre qu'une diminution de la stimulation de l'inflammasome, associée à une réduction de la sécrétion d'IL-1 β est responsable d'une meilleure survie dans le modèle de pneumonie à *P. aeruginosa*.

Nous avons donc exploré cette réponse liée à l'IL-22 lors de la colonisation par *C. albicans* et liée à l'IL-17 et à l'IL-22 lors de la pneumonie à *P. aeruginosa*. L'utilisation d'anticorps bloquant l'IL-17 ne s'est pas accompagnée d'une perte de l'effet protecteur. En revanche les souris traitées par un anticorps anti-IL-22 ont perdu la protection conférée par la colonisation à *C. albicans*. Cependant, l'IL-22 n'est pas la seule cytokine responsable de la protection car l'instillation d'IL-22 ne protège les souris que dans le modèle neutropénique. En plus du remaniement épithélial qui a déjà été décrit (161), l'IL-22 induit également des peptides antimicrobiens, et notamment les β -défensines et la cathelicidine. Ces peptides pourraient jouer un rôle dans l'effet protecteur (72,122).

Les cellules sécrétrices d'IL-17 et d'IL-22 sont principalement les lymphocytes et la littérature rapporte trois autres types cellulaires capables de les sécréter en quantité significative : les cellules NK, les cellules invariantes NKT et les cellules lymphoïdes innées (ILC) (162). Nous avons donc cherché la source d'IL-22 dans le poumon et mis en évidence que les ILC étaient responsables de cette sécrétion, les autres cellules ayant un marquage très inférieurs. De plus, la déplétion des ILC est responsable d'une diminution majeure de la sécrétion d'IL-22 et d'IL-17 au cours de la colonisation et de la pneumonie.

Ces ILC sont des cellules issues de la lignée lymphoïde, expriment le facteur de transcription ROR γ t, mais sont dépourvues des marqueurs spécifiques classiques B ou T (CD3, CD5, CD8, CD19, TCR). Elles expriment le CD4 et sont localisées au niveau des muqueuses et des organes lymphoïdes secondaires (59,154,163). Elles constituent la source majeure d'IL-22 dans l'organisme. Leur rôle évoqué est transitoire, en attendant que la réponse T_H17/22, adaptative se mette en place (155). Ces ILC regroupées sous le label ILC3 semblent importantes en pathologie (126), notamment dans le maintien de l'intégrité des muqueuses au niveau digestif. Cette étude montrait que lors de la déplétion des ILC par un anticorps, les bactéries étaient capables de disséminer à partir du tube digestif et d'entraîner

une infection. Notre étude est la première à mettre en évidence l'importance des ILC dans les pneumonies bactériennes et la protection qu'elles peuvent conférer lors de leur recrutement. Certaines études commencent à s'intéresser à ces cellules dans les inflammations aseptiques, notamment l'asthme (164) ou au cours des infections virales (165). Mais les ILC ne sont pas positives que pour l'IL-22 : toutes les cellules positives pour l'IL-22 le sont aussi pour l'IL-17 et représentent là encore la population cellulaire majoritaire sécrétrice d'IL-17: les ILC3. Ceci est vrai à la fois lors de la colonisation par *C. albicans*, mais également au cours de la pneumonie à *P. aeruginosa*, au cours de laquelle l'IL-17 augmente significativement dans le groupe de souris préalablement exposées à *C. albicans* comparativement aux souris infectées par *P. aeruginosa* seul. Les ILC seraient donc la source d'IL-17 et d'IL-22 au cours de la pneumonie. Cela les classe en ILC3, si l'on s'en réfère à la proposition d'uniformisation des nomenclatures (166).

Malheureusement, le stimulus direct responsable du recrutement des ILC est inconnu, et l'exploration de la voie CCL20 n'a pas permis de mettre en évidence de rôle pour cette chimiokine dans le recrutement des ILC. Pourtant, les ILC3 expriment majoritairement le récepteur pour cette chimiokine: le CCR6. Mais une autre piste pourrait être explorée : deux équipes ont récemment mis en évidence l'importance des métabolites bactériens et fongiques du tryptophane au cours de la colonisation du tube digestif par des bactéries commensales et *C. albicans* (57,58,167). Ces métabolites du tryptophane peuvent être reconnus par un récepteur eucaryote, l'Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR). Cet AHR est présent à la surface des ILC3, et sa stimulation est responsable d'une augmentation de la synthèse d'IL-22 par ces cellules (57,58). La stimulation de l'AHR est responsable, dans des modèles animaux d'une résistance à la candidose, alors que l'inactivation de ce récepteur entraîne une aggravation de la candidose. Cependant, il semblerait que la source de catabolites du tryptophane soit la flore bactérienne résidente, et pas *C. albicans* (58). Cependant, l'exploration de l'effet des métabolites du tryptophane dans notre modèle permettrait peut-être de lier les ILC à la colonisation par *C. albicans*.

En effet, *C. albicans* reste un pathogène opportuniste et nous n'avons pas réussi à isoler le ou les composants qui pourraient permettre de reproduire aussi efficacement l'effet protecteur. Le fait que la forme vivante de *C. albicans* soit plus efficace que la forme atténuée montre l'importance de la présentation des structures immuno-modulatrices dans l'effet protecteur. Soit ces structures requièrent un environnement particulier (association de différents composants) pour être effective, soit elles doivent atteindre un compartiment cellulaire dans les cellules cibles que seules peuvent atteindre les formes vivantes de ce

champignon, soit le métabolisme du champignon lui-même produit des substances qui seront reconnues par le système immunitaire. De plus, les étapes d'atténuation de *C. albicans* et les étapes de séparation des différents composants peuvent aussi expliquer la perte d'activité de ces différents éléments. Des analyses complémentaires s'avèrent nécessaire pour définir ces différents éléments.

CONCLUSION

La colonisation des voies aériennes par *C. albicans* permet le recrutement au poumon d'ILC3 qui sécrètent précocement de l'IL-22. L'IL-22 a une action principalement épithéliale, promouvant l'expression de molécules d'adhésions, de chimiokines et la synthèse de peptides antimicrobiens. Lors de la pneumonie à *P. aeruginosa*, la présence des ILC dans le poumon permet une sécrétion plus précoce de cytokines pro-inflammatoires, notamment d'IL-17 et d'IL-22, un recrutement plus important de PNN au niveau pulmonaire et une diminution de l'inflammation délétère, reflétée par une diminution de l'IL-1 β . Cette réponse plus précoce permet une survie améliorée des souris colonisées par *C. albicans* au cours de la pneumonie à *P. aeruginosa*. Cela permet de proposer un schéma de la réponse protectrice induite par *C. albicans* (Figure 18). Cette réponse est spécifique, car l'utilisation de LPS et de levures avec un pouvoir pathogène moins important n'entraîne pas un niveau de protection aussi important. Malheureusement, les voies moléculaires responsables du recrutement des ILC au niveau du poumon et les PRR stimulés par *C. albicans* permettant le recrutement des ILC au niveau du poumon demeurent inconnus à ce jour.

Cette étude est la première à mettre en évidence le rôle protecteur des ILC au cours des pneumonies bactériennes. Le recrutement des ILC pourrait être l'un des marqueurs

d'efficacité de l'immunothérapie. En revanche les recherches doivent se poursuivre pour identifier la ou les structures antigéniques qui permettront le recrutement des ILC au poumon et leur activation, afin de remplacer la colonisation des voies aériennes par une molécule sans pouvoir pathogène. L'identification des récepteurs cibles et des voies de signalisation impliquées faciliterait cette approche. Il est également important de préciser le champ d'application de ces observations à la clinique, en particulier chez les patients immunodéprimés.

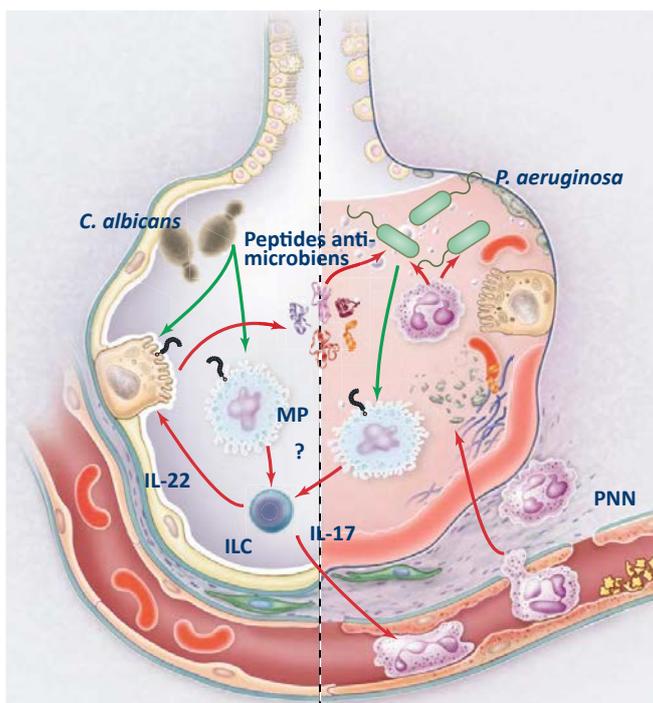


Figure 18: Modèle de la réponse induite par *P. aeruginosa* après exposition à *C. albicans*.
Adapté de (14)

BIBLIOGRAPHIE

1. Hirsch EB, Tam VH. Impact of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* infection on patient outcomes. *Expert Rev Pharmacoecon Outcomes Res.* 2010 Aug;10(4):441–51.
2. Azoulay E, Timsit J-F, Tafflet M, de Lassence A, Darmon M, Zahar J-R, et al. *Candida* colonization of the respiratory tract and subsequent *pseudomonas* ventilator-associated pneumonia. *Chest.* 2006 Jan 1;129(1):110–7.
3. Ader F, Jawhara S, Nseir S, Kipnis E, Faure K, Vuotto F, et al. Short term *Candida albicans* colonization reduces *Pseudomonas aeruginosa*-related lung injury and bacterial burden in a murine model. *Crit Care.* 2011;15(3):R150.
4. Hogan DA, Vik A, Kolter R. A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. *Mol Microbiol.* 2004 Dec 1;54(5):1212–23.
5. Cugini C, Calfee MW, Farrow JM, Morales DK, Pesci EC, Hogan DA. Farnesol, a common sesquiterpene, inhibits PQS production in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol.* 2007 Aug 1;65(4):896–906.
6. Torres A, Peetermans WE, Viegi G, Blasi F. Risk factors for community-acquired pneumonia in adults in Europe: a literature review. *Thorax.* 2013 Nov;68(11):1057–65.
7. Chastre J, Fagon J-Y. Ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Apr 1;165(7):867–903.
8. Fujitani S, Sun H-Y, Yu VL, Weingarten JA. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part I: epidemiology, clinical diagnosis, and source. *Chest.* 2011 Apr;139(4):909–19.
9. Sun H-Y, Fujitani S, Quintiliani R, Yu VL. Pneumonia due to *Pseudomonas aeruginosa*: part II: antimicrobial resistance, pharmacodynamic concepts, and antibiotic therapy. *Chest.* 2011 May;139(5):1172–85.
10. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol.* 2009 Sep;58(Pt 9):1133–48.
11. Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis.* 2013 Apr;67(3):159–73.
12. Mizgerd JP. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med.* 2008 Feb 14;358(7):716–27.
13. Wissinger E, Goulding J, Hussell T. Immune homeostasis in the respiratory tract and its impact on heterologous infection. *Semin Immunol.* 2009 Jun;21(3):147–55.
14. Ware LB, Matthay MA. The acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med.*

2000 May 4;342(18):1334–49.

15. Mizgerd JP, Skerrett SJ. Animal models of human pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Mar;294(3):L387–98.
16. Su X, Looney M, Robriquet L, Fang X, Matthay MA. Direct visual instillation as a method for efficient delivery of fluid into the distal airspaces of anesthetized mice. *Experimental lung research*. 2004 Sep;30(6):479–93.
17. Miller MA, Stabenow JM, Parvathareddy J, Wodowski AJ, Fabrizio TP, Bina XR, et al. Visualization of murine intranasal dosing efficiency using luminescent *Francisella tularensis*: effect of instillation volume and form of anesthesia. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e31359.
18. Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, König C, Hebestreit H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros*. 2008 Mar;7(2):123–7.
19. Wilder CN, Allada G, Schuster M. Instantaneous within-patient diversity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing populations from cystic fibrosis lung infections. *Infect Immun*. 2009 Dec 1;77(12):5631–9.
20. Boyer S, Faure K, Ader F, Husson MO, Kipnis E, Prangère T, et al. Chronic pneumonia with *Pseudomonas aeruginosa* and impaired alveolar fluid clearance. *Respir Res*. 2005;6:17.
21. Luna CM, Sibila O, Agusti C, Torres A. Animal models of ventilator-associated pneumonia. *European Respiratory Journal*. 2009 Jan 1;33(1):182–8.
22. Robriquet L, Collet F, Tournoys A, Prangère T, Nevière R, Fourrier F, et al. Intravenous administration of activated protein C in *Pseudomonas*-induced lung injury: impact on lung fluid balance and the inflammatory response. *Respir Res*. 2006;7:41.
23. Rezaiguia S, Garat C, Delclaux C, Meignan M, Fleury J, Legrand P, et al. Acute bacterial pneumonia in rats increases alveolar epithelial fluid clearance by a tumor necrosis factor- α -dependent mechanism. *J Clin Invest*. 1997 Jan 15;99(2):325–35.
24. Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*. 2012 Aug 1;122(8):2731–40.
25. Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR. Animal models of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2008 Sep;295(3):L379–99.
26. Boutoille D, Marechal X, Pichenot M, Chemani C, Guery B, Faure K. FITC-albumin as a marker for assessment of endothelial permeability in mice: comparison with 125I-albumin. *Experimental lung research*. 2009 May;35(4):263–71.
27. Landolt CC, Matthay MA, Albertine KH, Roos PJ, Wiener-Kronish JP, Staub NC. Overperfusion, hypoxia, and increased pressure cause only hydrostatic

- pulmonary edema in anesthetized sheep. *Circulation Research*. 1983 Mar 1;52(3):335–41.
28. Modelska K, Pittet JF, Folkesson HG, Courtney Broaddus V, Matthay MA. Acid-induced lung injury. Protective effect of anti-interleukin-8 pretreatment on alveolar epithelial barrier function in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999 Nov;160(5 Pt 1):1450–6.
 29. Lee JW, Fang X, Gupta N, Serikov V, Matthay MA. Allogeneic human mesenchymal stem cells for treatment of *E. coli* endotoxin-induced acute lung injury in the ex vivo perfused human lung. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009 Sep 22;106(38):16357–62.
 30. Roux D, Gaudry S, Khoy-Ear L, Aloulou M, Phillips-Houlbracq M, Bex J, et al. Airway fungal colonization compromises the immune system allowing bacterial pneumonia to prevail. *Crit Care Med*. 2013 Sep;41(9):e191–9.
 31. Roux D, Gaudry S, Ear LK, Denamur E, Dreyfuss D, Ricard J. *Candida albicans* Airway Colonization Favors Bacterial Pneumonia. 2010 Apr 9;:1–1.
 32. Clancy CJ, Cheng S, Nguyen MH. Animal models of candidiasis. *Methods Mol Biol*. 2009;499:65–76.
 33. Jones T, Federspiel NA, Chibana H, Dungan J, Kalman S, Magee BB, et al. The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 May 11;101(19):7329–34.
 34. Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, et al. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010 Mar 5;6(3):251–64.
 35. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Micro*. 2011;9(10):737–48.
 36. Gow NAR, van de Veerdonk FL, Brown AJP, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Micro*. 2012 Feb;10(2):112–22.
 37. Netea MG, Brown GD, Kullberg BJ, Gow NAR. An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system. *Nat Rev Micro*. 2008 Jan 1;6(1):67–78.
 38. Hornby JM, Jensen EC, Lisec AD, Tasto JJ, Jahnke B, Shoemaker R, et al. Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol. *Appl Environ Microbiol*. 2001 Jul 1;67(7):2982–92.
 39. Kebaara BW, Langford ML, Navarathna DHMLP, Dumitru R, Nickerson KW, Atkin AL. *Candida albicans* *Tup1* is involved in farnesol-mediated inhibition of filamentous-growth induction. *Eukaryotic Cell*. 2008 Jun 1;7(6):980–7.
 40. Chen H, Fujita M, Feng Q, Clardy J, Fink GR. Tyrosol is a quorum-sensing

- molecule in *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Apr 6;101(14):5048–52.
41. Madhani HD. Quorum sensing in fungi: Q&A. *PLoS Pathog*. 2011 Oct;7(10):e1002301.
 42. Kumamoto CA, Vences MD. Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces. *Annu Rev Microbiol*. 2005;59:113–33.
 43. Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryotic Cell*. 2005 Apr 1;4(4):633–8.
 44. Ramage G, Saville SP, Wickes BL, López-Ribot JL. Inhibition of *Candida albicans* biofilm formation by farnesol, a quorum-sensing molecule. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Nov 1;68(11):5459–63.
 45. Morales DK, Hogan DA. *Candida albicans* interactions with bacteria in the context of human health and disease. *PLoS Pathog*. 2010 Jan 1;6(4):e1000886.
 46. Angebault C, Djossou F, Abélanet S, Permal E, Ben Soltana M, Diancourt L, et al. *Candida albicans* Is Not Always the Preferential Yeast Colonizing Humans: A Study in Wayampi Amerindians. *J INFECT DIS*. 2013 Nov;208(10):1705–16.
 47. Kennedy MJ, Volz PA. Ecology of *Candida albicans* gut colonization: inhibition of *Candida* adhesion, colonization, and dissemination from the gastrointestinal tract by bacterial antagonism. *Infect Immun*. 1985 Sep 1;49(3):654–63.
 48. Martin R, Wächtler B, Schaller M, Wilson D, Hube B. Host–pathogen interactions and virulence-associated genes during *Candida albicans* oral infections. *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier GmbH; 2011 Jun 1;301(5):417–22.
 49. Norice CT, Smith FJ, Solis N, Filler SG, Mitchell AP. Requirement for *Candida albicans* Sun41 in biofilm formation and virulence. *Eukaryotic Cell*. 2007 Nov;6(11):2046–55.
 50. Liu Y, Mittal R, Solis NV, Prasadarao NV, Filler SG. Mechanisms of *Candida albicans* Trafficking to the Brain. Cowen LE, editor. *PLoS Pathog*. 2011 Oct 6;7(10):e1002305.
 51. Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* Secreted Aspartyl Proteinases in Virulence and Pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003 Sep 9;67(3):400–28.
 52. Felk A, Kretschmar M, Albrecht A, Schaller M, Beinhauer S, Nichterlein T, et al. *Candida albicans* Hyphal Formation and the Expression of the Efg1-Regulated Proteinases Sap4 to Sap6 Are Required for the Invasion of Parenchymal Organs. *Infect Immun*. 2002 Jul 1;70(7):3689–700.
 53. Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. virulence. 2013 Feb 15;4(2):119–28.

54. Lo HJ, Köhler JR, DiDomenico B, Loebenberg D, Cacciapuoti A, Fink GR. Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell*. 1997 Sep 5;90(5):939–49.
55. Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial-fungal interactions. *Nat Rev Micro*. 2010 May 1;8(5):340–9.
56. Meersseman W, Lagrou K, Spriet I, Maertens J, Verbeken E, Peetermans WE, et al. Significance of the isolation of *Candida* species from airway samples in critically ill patients: a prospective, autopsy study. *Intensive Care Med*. 2009 Sep 1;35(9):1526–31.
57. Qiu J, Guo X, Chen Z-ME, He L, Sonnenberg GF, Artis D, et al. Group 3 innate lymphoid cells inhibit T-cell-mediated intestinal inflammation through aryl hydrocarbon receptor signaling and regulation of microflora. *Immunity*. 2013 Aug 22;39(2):386–99.
58. Zelante T, Iannitti RG, Cunha C, De Luca A, Giovannini G, Pieraccini G, et al. Tryptophan catabolites from microbiota engage aryl hydrocarbon receptor and balance mucosal reactivity via interleukin-22. *Immunity*. 2013 Aug 22;39(2):372–85.
59. Sonnenberg GF, Fouser LA, Artis D. Border patrol: regulation of immunity, inflammation and tissue homeostasis at barrier surfaces by IL-22. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2011 May 1;12(5):383–90.
60. Azie N, Neofytos D, Pfaller M, Meier-Kriesche H-U, Quan S-P, Horn D. The PATH (Prospective Antifungal Therapy) Alliance® registry and invasive fungal infections: update 2012. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 2012 Aug;73(4):293–300.
61. Lewis RE. Overview of the changing epidemiology of candidemia. *Curr Med Res Opin*. 2009 Jul;25(7):1732–40.
62. Pittet D, Monod M, Suter PM, Frenk E, Auckenthaler R. *Candida* colonization and subsequent infections in critically ill surgical patients. *Ann Surg*. 1994 Dec;220(6):751–8.
63. Koh AY, Köhler JR, Coggshall KT, van Rooijen N, Pier Gerald B. Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination. *PLoS Pathog*. 2008 Feb 8;4(2):e35.
64. Moyes DL, Naglik JR. Mucosal Immunity and *Candida albicans* Infection. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:1–9.
65. van der Meer JWM, van de Veerdonk FL, Joosten LAB, Kullberg B-J, Netea MG. Severe *Candida* spp. infections: new insights into natural immunity. *Int J Antimicrob Agents*. 2010 Dec 1;36 Suppl 2:S58–62.
66. Cassone A, Cauda R. *Candida* and candidiasis in HIV-infected patients: where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders. *AIDS*. 2012 Jul 31;26(12):1457–72.

67. Cypowij S, Picard C, Maródi L, Casanova J-L, Puel A. Immunity to infection in IL-17-deficient mice and humans. *Eur J Immunol*. 2012 Sep;42(9):2246–54.
68. Gaffen SL, Hernández-Santos N, Peterson AC. IL-17 signaling in host defense against *Candida albicans*. *Immunol Res*. 2011 Aug;50(2-3):181–7.
69. Puel A, Cypowij S, Bustamante J, Wright JF, Liu L, Lim HK, et al. Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity. *Science*. 2011 Apr 1;332(6025):65–8.
70. Netea MG, van der Meer JWM. Immunodeficiency and genetic defects of pattern-recognition receptors. *N Engl J Med*. 2011 Jan 6;364(1):60–70.
71. Ferwerda B, Ferwerda G, Plantinga TS, Willment JA, van Spriël AB, Venselaar H, et al. Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections. *N Engl J Med*. 2009 Oct 29;361(18):1760–7.
72. de Luca A, Zelante T, D'angelo C, Zagarella S, Fallarino F, Spreca A, et al. IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance. *Mucosal Immunol*. 2010 Jul 1;3(4):361–73.
73. Maródi L, Cypowij S, Tóth B, Chernyshova L, Puel A, Casanova J-L. Molecular mechanisms of mucocutaneous immunity against *Candida* and *Staphylococcus* species. *J Allergy Clin Immunol*. 2012 Nov;130(5):1019–27.
74. van de Veerdonk FL, Marijnissen RJ, Kullberg BJ, Koenen HJPM, Cheng S-C, Joosten I, et al. The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*. 2009 Apr 23;5(4):329–40.
75. Hanna S, Etzioni A, Etzioni A. New host defense mechanisms against *Candida* species clarify the basis of clinical phenotypes. *J Allergy Clin Immunol*. 2011 Jun;127(6):1433–7.
76. Puel A, Picard C, Cypowij S, Lilic D, Abel L, Casanova J-L. Inborn errors of mucocutaneous immunity to *Candida albicans* in humans: a role for IL-17 cytokines? *Curr Opin Immunol*. 2010 Aug;22(4):467–74.
77. 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 May 21;459(7245):433–6.
78. Cheng S-C, van de Veerdonk FL, Lenardon M, Stoffels M, Plantinga T, Smeekens S, et al. The dectin-1/inflammasome pathway is responsible for the induction of protective T-helper 17 responses that discriminate between yeasts and hyphae of *Candida albicans*. *Journal of Leukocyte Biology*. 2011 Aug;90(2):357–66.
79. 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 Feb 1;38(2):500–6.
80. Miao EA, Leaf IA, Treuting PM, Mao DP, Dors M, Sarkar A, et al. Caspase-1-

induced pyroptosis is an innate immune effector mechanism against intracellular bacteria. *Nat Immunol.* 2010 Dec;11(12):1136–42.

81. Dinarello CA. IL-1: discoveries, controversies and future directions. *Eur J Immunol.* 2010 Mar 1;40(3):599–606.
82. Hugh R, Leifson E. The proposed neotype strains of *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy.* Soc General Microbiol; 1964;14(2):69–84.
83. Véron M. Sur l'opportunité de conserver le nom d'espèce *Pseudomonas pyocyanea* (Gessard 1882) Migula 1895 Requête pour une opinion. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy.* Soc General Microbiol; 1965;15(4):187–90.
84. Bogunia-Kubik K, Duda D, Suchnicki K, Lange A. CCR5 deletion mutation and its association with the risk of developing acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica.* 2006 Dec 1;91(12):1628–34.
85. Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrener P, Hickey MJ, et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature.* 2000 Aug 31;406(6799):959–64.
86. Toft C, Andersson SG. Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. *Nature reviews genetics.* Nature Publishing Group; 2010;11(7):465–75.
87. Khan NH, Ishii Y, Kimata-Kino N, Esaki H, Nishino T, Nishimura M, et al. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* from open ocean and comparison with freshwater, clinical, and animal isolates. *Microb Ecol.* 2007 Feb 1;53(2):173–86.
88. Hibbing ME, Fuqua C, Parsek MR, Peterson SB. Bacterial competition: surviving and thriving in the microbial jungle. *Nat Rev Micro.* 2010 Jan 1;8(1):15–25.
89. Griffin AS, West SA, Buckling A. Cooperation and competition in pathogenic bacteria. *Nature.* 2004 Aug 26;430(7003):1024–7.
90. Harmsen M, Yang L, Pamp SJ, Tolker-Nielsen T. An update on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation, tolerance, and dispersal. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2010 Aug;59(3):253–68.
91. Stoodley P, Sauer K, Davies DG, Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology.* Annual Reviews 4139 El Camino Way, PO Box 10139, Palo Alto, CA 94303-0139, USA; 2002;56(1):187–209.
92. Miller MB, Bassler BL. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2001 Jan 1;55:165–99.
93. Bassler BL, Losick R. Bacterially speaking. *Cell.* 2006 Apr 21;125(2):237–46.

94. Le Berre R, Faure K, Nguyen S, Pierre M, Ader F, Guery B. Quorum sensing : une nouvelle cible thérapeutique pour *Pseudomonas aeruginosa*. *Med Mal Infect*. 2006 Jul;36(7):349–57.
95. Girard G, Bloemberg GV. Central role of quorum sensing in regulating the production of pathogenicity factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Future Microbiol*. 2008 Feb;3(1):97–106.
96. Williams P, Cámara M. Quorum sensing and environmental adaptation in *Pseudomonas aeruginosa*: a tale of regulatory networks and multifunctional signal molecules. *Curr Opin Microbiol*. 2009 Apr 1;12(2):182–91.
97. Coggan KA, Wolfgang MC. Global regulatory pathways and cross-talk control *pseudomonas aeruginosa* environmental lifestyle and virulence phenotype. *Curr Issues Mol Biol*. 2012;14(2):47–70.
98. Köhler T, Guanella R, Carlet J, van Delden C. Quorum sensing-dependent virulence during *Pseudomonas aeruginosa* colonisation and pneumonia in mechanically ventilated patients. *Thorax*. 2010 Aug 1;65(8):703–10.
99. O'Loughlin CT, Miller LC, Siryaporn A, Drescher K, Semmelhack MF, Bassler BL. A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 Oct 29;110(44):17981–6.
100. Hauser AR, Ozer E. *Pseudomonas aeruginosa*. *Nat Rev Micro*. 2011.
101. Kipnis E, Sawa T, Wiener-Kronish J. Targeting mechanisms of *Pseudomonas aeruginosa* pathogenesis. *Med Mal Infect*. 2006 Feb 1;36(2):78–91.
102. Bleves S, Viarre V, Salacha R, Michel GPF, Filloux A, Voulhoux R. *International Journal of Medical Microbiology*. *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier GmbH; 2010 Dec 1;300(8):534–43.
103. Stintzi A, Evans K, Meyer JM, Poole K. Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*: *lasR/lasI* mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. *FEMS Microbiol Lett*. 1998 Sep 15;166(2):341–5.
104. Lau GW, Hassett DJ, Ran H, Kong F. The role of pyocyanin in *Pseudomonas aeruginosa* infection. *Trends Mol Med*. 2004 Dec 1;10(12):599–606.
105. Lau GW, Ran H, Kong F, Hassett DJ, Mavrodi D. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infect Immun*. 2004 Jul 1;72(7):4275–8.
106. Jensen PO, Bjarnsholt T, Phipps R, Rasmussen TB, Calum H, Christoffersen L, et al. Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology (Reading, Engl)*. 2007 May 1;153(Pt 5):1329–38.
107. Köhler T, Curty LK, Barja F, van Delden C, Pechère JC. Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is dependent on cell-to-cell signaling and requires flagella and pili. *J Bacteriol*. 2000 Nov 1;182(21):5990–6.

108. Lyczak JB, Cannon CL, Pier Gerald B. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes Infect.* 2000 Jul 1;2(9):1051–60.
109. Le Berre R, Nguyen S, Nowak E, Kipnis E, Pierre M, Ader F, et al. Quorum-sensing activity and related virulence factor expression in clinically pathogenic isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Apr 1;14(4):337–43.
110. Hauser AR. The type III secretion system of *Pseudomonas aeruginosa*: infection by injection. *Nat Rev Micro.* 2009 Sep 1;7(9):654–65.
111. Miao EA, Mao DP, Yudkovsky N, Bonneau R, Lorang CG, Warren SE, et al. Innate immune detection of the type III secretion apparatus through the NLRC4 inflammasome. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010 Feb 16;107(7):3076–80.
112. Ohama M, Hiramatsu K, Miyajima Y, Kishi K, Nasu M, Kadota J-I. Intratracheal immunization with pili protein protects against mortality associated with *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2006 Jun 1;47(1):107–15.
113. Winzer K, Falconer C, Garber NC, Diggle SP, Camara M, Williams P. The *Pseudomonas aeruginosa* lectins PA-IL and PA-III are controlled by quorum sensing and by RpoS. *J Bacteriol.* 2000 Nov 1;182(22):6401–11.
114. Chemani C, Imberty A, de Bentzmann S, Pierre M, Wimmerova M, Guery BP, et al. Role of LecA and LecB lectins in *Pseudomonas aeruginosa*-induced lung injury and effect of carbohydrate ligands. *Infect Immun.* 2009 May 1;77(5):2065–75.
115. Goldberg JB. Why is *Pseudomonas aeruginosa* a pathogen? *F1000 Biol Rep.* 2010;2.
116. Sharma BR, Harish D, Singh VP, Bangar S. Septicemia as a cause of death in burns: an autopsy study. *Burns.* 2006 Aug;32(5):545–9.
117. Koh AY, Priebe GP, Ray C, van Rooijen N, Pier Gerald B. Inescapable need for neutrophils as mediators of cellular innate immunity to acute *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Immun.* 2009 Dec 1;77(12):5300–10.
118. Hertz CJ, Wu Q, Porter EM, Zhang YJ, Weismüller K-H, Godowski PJ, et al. Activation of Toll-like receptor 2 on human tracheobronchial epithelial cells induces the antimicrobial peptide human beta defensin-2. *J Immunol.* 2003 Dec 15;171(12):6820–6.
119. Skerrett SJ, Wilson CB, Liggitt HD, Hajjar AM. Redundant Toll-like receptor signaling in the pulmonary host response to *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2007 Jan 1;292(1):L312–22.
120. van Maele L, Carnoy C, Cayet D, Songhet P, Dumoutier L, Ferrero I, et al. TLR5 signaling stimulates the innate production of IL-17 and IL-22 by CD3(neg)CD127+ immune cells in spleen and mucosa. *The Journal of*

- Immunology. 2010 Jul 15;185(2):1177–85.
121. Rogan MP, Geraghty P, Greene CM, O'Neill SJ, Taggart CC, McElvaney NG. Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence. *Respir Res.* 2006 Jan 1;7:29.
 122. Aujla SJ, Chan YR, Zheng M, Fei M, Askew DJ, Pociask DA, et al. IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nat Med.* 2008 Feb 10;14(3):275–81.
 123. Bals R, Weiner DJ, Moscioni AD, Meegalla RL, Wilson JM. Augmentation of innate host defense by expression of a cathelicidin antimicrobial peptide. *Infect Immun.* 1999 Nov 1;67(11):6084–9.
 124. Bals R, Wang X, Zasloff M, Wilson JM. The peptide antibiotic LL-37/hCAP-18 is expressed in epithelia of the human lung where it has broad antimicrobial activity at the airway surface. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998 Aug 4;95(16):9541–6.
 125. Koh AY, Priebe GP, Pier Gerald B. Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in a murine model of gastrointestinal colonization and dissemination in neutropenia. *Infect Immun.* 2005 Apr 1;73(4):2262–72.
 126. Sonnenberg GF, Monticelli LA, Alenghat T, Fung TC, Hutnick NA, Kunisawa J, et al. Innate lymphoid cells promote anatomical containment of lymphoid-resident commensal bacteria. *Science.* 2012 Jun 8;336(6086):1321–5.
 127. Maus UA, Koay MA, Delbeck T, Mack M, Ermert M, Ermert L, et al. Role of resident alveolar macrophages in leukocyte traffic into the alveolar air space of intact mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002 Jun;282(6):L1245–52.
 128. Kocourek J, Ballou CE. Method for fingerprinting yeast cell wall mannans. *J Bacteriol.* 1969 Dec;100(3):1175–81.
 129. Mora-Montes HM, McKenzie C, Bain JM, Lewis LE, Erwig LP, Gow NAR. Interactions between macrophages and cell wall oligosaccharides of *Candida albicans*. *Methods Mol Biol.* 2012;845:247–60.
 130. Sutterwala FS, Mijares LA, Li L, Ogura Y, Kazmierczak BI, Flavell RA. Immune recognition of *Pseudomonas aeruginosa* mediated by the IPAF/NLRC4 inflammasome. *Journal of Experimental Medicine.* 2007 Dec 24;204(13):3235–45.
 131. Villamón E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Fradelizi D, Gil ML. Toll-like receptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes Infect.* 2004 Jan 1;6(1):1–7.
 132. Sawa S, Cherrier M, Lochner M, Satoh-Takayama N, Fehling HJ, Langa F, et al. Lineage relationship analysis of ROR γ mat+ innate lymphoid cells. *Science.* 2010 Oct 29;330(6004):665–9.
 133. Muñoz N, van Maele L, Marqués JM, Rial A, Sirard J-C, Chabalgoity JA.

- Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun*. 2010 Oct 1;78(10):4226–33.
134. Brandl K, Plitas G, Mihu CN, Ubeda C, Jia T, Fleisher M, et al. Vancomycin-resistant enterococci exploit antibiotic-induced innate immune deficits. *Nature*. 2008 Oct 9;455(7214):804–7.
 135. Evans SE, Scott BL, Clement CG, Larson DT, Kontoyiannis D, Lewis RE, et al. Stimulated innate resistance of lung epithelium protects mice broadly against bacteria and fungi. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Jan 1;42(1):40–50.
 136. Kerr KG, Snelling AM. *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. *J Hosp Infect*. 2009 Dec;73(4):338–44.
 137. Liu J, Feng Y, Yang K, Li Q, Ye L, Han L, et al. Early production of IL-17 protects against acute pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2011 Mar;61(2):179–88.
 138. Warner N, Nunez G. MyD88: a critical adaptor protein in innate immunity signal transduction. *J Immunol*. 2013 Jan 1;190(1):3–4.
 139. Clement CG, Evans SE, Evans CM, Hawke D, Kobayashi R, Reynolds PR, et al. Stimulation of lung innate immunity protects against lethal pneumococcal pneumonia in mice. *Am J Respir Crit Care Med*. 2008 Jun 15;177(12):1322–30.
 140. Jean D, Rezaiguia-Delclaux S, Delacourt C, Leclercq R, Lafuma C, Brun-Buisson C, et al. Protective effect of endotoxin instillation on subsequent bacteria-induced acute lung injury in rats. *Am J Respir Crit Care Med*. 1998 Dec;158(6):1702–8.
 141. Evans SE, Tuvim MJ, Fox CJ, Sachdev N, Gibiansky L, Dickey BF. Inhaled innate immune ligands to prevent pneumonia. *British Journal of Pharmacology*. 2011 May;163(1):195–206.
 142. Ramphal R, balloy V, Huerre M, Si-Tahar M, Chignard M. TLRs 2 and 4 are not involved in hypersusceptibility to acute *Pseudomonas aeruginosa* lung infections. *J Immunol*. 2005 Sep 15;175(6):3927–34.
 143. Picard C, Casanova J-L, Puel A. Infectious diseases in patients with IRAK-4, MyD88, NEMO, or I κ B α deficiency. *Clin Microbiol Rev*. 2011 Jul;24(3):490–7.
 144. Moyes DL, Murciano C, Runglall M, Kohli A, Islam A, Naglik JR. Activation of MAPK/c-Fos induced responses in oral epithelial cells is specific to *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* hyphae. *Med Microbiol Immunol*. 2012 Feb;201(1):93–101.
 145. Hise AG, Tomalka J, Ganesan S, Patel K, Hall BA, Brown GD, et al. An essential role for the NLRP3 inflammasome in host defense against the human fungal pathogen *Candida albicans*. *Cell Host Microbe*. 2009 May 8;5(5):487–97.
 146. Blander JM, Sander LE. Beyond pattern recognition: five immune checkpoints for scaling the microbial threat. *Nat Rev Immunol*. 2012 Mar;12(3):215–25.

147. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KHG, Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 2006 Jul 10;203(7):1685–91.
148. Vázquez-Torres A, Balish E. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1997 Jun 1;61(2):170–92.
149. Bistoni F, Vecchiarelli A, Cenci E, Puccetti P, Marconi P, Cassone A. Evidence for macrophage-mediated protection against lethal *Candida albicans* infection. *Infect Immun*. 1986 Feb 1;51(2):668–74.
150. Kooguchi K, Hashimoto S, Kobayashi A, Kitamura Y, Kudoh I, Wiener-Kronish J, et al. Role of alveolar macrophages in initiation and regulation of inflammation in *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Infect Immun*. 1998 Jul;66(7):3164–9.
151. Wesselkamper SC, Eppert BL, Motz GT, Lau GW, Hassett DJ, Borchers MT. NKG2D is critical for NK cell activation in host defense against *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infection. *J Immunol*. 2008 Oct 15;181(8):5481–9.
152. Halwani R, Al-Muhsen S, Hamid Q. T helper 17 cells in airway diseases: from laboratory bench to bedside. *Chest*. 2013 Feb 1;143(2):494–501.
153. van de Veerdonk FL, Netea MG. T-cell Subsets and Antifungal Host Defenses. *Curr Fungal Infect Rep*. 2010 Dec 1;4(4):238–43.
154. Spits H, Di Santo JP. The expanding family of innate lymphoid cells: regulators and effectors of immunity and tissue remodeling. *Nat Immunol*. 2011 Jan 1;12(1):21–7.
155. Di Santo JP, Vosshenrich CAJ, Satoh-Takayama N. A “natural” way to provide innate mucosal immunity. *Curr Opin Immunol*. 2010 Aug;22(4):435–41.
156. Conti HR, Gaffen SL. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. *Microbes Infect*. 2010 Jul 1;12(7):518–27.
157. Paats MS, Bergen IM, Hanselaar WEJJ, van Zoelen ECG, Verbrugh HA, Hoogsteden HC, et al. T helper 17 cells are involved in the local and systemic inflammatory response in community-acquired pneumonia. *Thorax*. 2013 May;68(5):468–74.
158. Ye P, Garvey PB, Zhang P, Nelson S, Bagby G, Summer WR, et al. Interleukin-17 and lung host defense against *Klebsiella pneumoniae* infection. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2001 Sep 1;25(3):335–40.
159. Priebe GP, Walsh RL, Cederroth TA, Kamei A, Coutinho-Sledge YS, Goldberg JB, et al. IL-17 is a critical component of vaccine-induced protection against lung infection by lipopolysaccharide-heterologous strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Immunol*. 2008 Oct 1;181(7):4965–75.
160. Faure E, Mear J-B, Faure K, Normand S, Couturier-Maillard A, Grandjean T, et al. *Pseudomonas aeruginosa* Type-3 secretion system dampens host defense by exploiting NLRC4 inflammasome. ” *American Journal of respiratory and critical*

care medicine

161. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *Journal of Experimental Medicine*. 2010 Jun 7;207(6):1293–305.
162. Witte E, Witte K, Warszawska K, Sabat R, Wolk K. Interleukin-22: a cytokine produced by T, NK and NKT cell subsets, with importance in the innate immune defense and tissue protection. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2010 Oct;21(5):365–79.
163. Walker JA, Barlow JL, McKenzie ANJ. Innate lymphoid cells--how did we miss them? *Nat Rev Immunol*. 2013 Feb;13(2):75–87.
164. Sonnenberg GF, Nair MG, Kirn TJ, Zaph C, Fouser LA, Artis D. Pathological versus protective functions of IL-22 in airway inflammation are regulated by IL-17A. *Journal of Experimental Medicine*. 2010 Jun 7;207(6):1293–305.
165. Chang Y-J, Kim HY, Albacker LA, Baumgarth N, McKenzie ANJ, Smith DE, et al. Innate lymphoid cells mediate influenza-induced airway hyper-reactivity independently of adaptive immunity. *Nat Immunol*. Nature Publishing Group; 2011 May 29;12(7):631–8.
166. Spits H, Artis D, Colonna M, Diefenbach A, Di Santo JP, Eberl G, et al. Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2013 Feb 1;13(2):145–9.
167. Bozza S, Fallarino F, Pitzurra L, Zelante T, Montagnoli C, Bellocchio S, et al. A crucial role for tryptophan catabolism at the host/*Candida albicans* interface. *J Immunol*. 2005 Mar 1;174(5):2910–8.

RÉSUMÉ

Pseudomonas aeruginosa et *Candida albicans* sont deux pathogènes opportunistes fréquemment co-isolés au niveau des voies aériennes des patients de soins intensifs. Dans un modèle murin, la colonisation des voies aériennes par *C. albicans* protège contre les lésions pulmonaires induites par *P. aeruginosa*. Le but de cette étude était de caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires responsables de cet effet protecteur.

La colonisation des voies aériennes par *C. albicans* permet le recrutement et l'activation de cellules NK, de cellules lymphoïdes innées, de macrophages et de cellules dendritiques. Ce recrutement est associé à la sécrétion d'IL-22. L'inhibition de l'IL-22 est responsable d'une perte de la protection conférée par *C. albicans*. Nous avons identifié par cytométrie en flux que les cellules lymphoïdes innées étaient la seule source cellulaire d'IL-22. La déplétion spécifique de ces cellules lymphoïdes innées par des anticorps anti-CD90.2 était responsable d'une diminution de la sécrétion d'IL-22 et d'une diminution de la survie lors de la pneumonie à *P. aeruginosa*. Nos résultats montrent donc que la production d'IL-22, principalement par les cellules lymphoïdes innées, est une étape inductible majeure dans la protection contre les lésions pulmonaires induites par *P. aeruginosa*. Cette cytokine pourrait ainsi représenter une cible thérapeutique pour prévenir les lésions pulmonaires induites par *P. aeruginosa*.