



HAL
open science

Médiateurs lipidiques de l'inflammation et populations lymphocytaires au cours des infections à Pneumocystis : études cliniques et modèle murin

Eléna Charpentier

► **To cite this version:**

Eléna Charpentier. Médiateurs lipidiques de l'inflammation et populations lymphocytaires au cours des infections à Pneumocystis : études cliniques et modèle murin. Microbiologie et Parasitologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2020. Français. NNT : 2020TOU30307 . tel-03549225

HAL Id: tel-03549225

<https://theses.hal.science/tel-03549225>

Submitted on 31 Jan 2022

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.

THÈSE

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

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Eléna CHARPENTIER

Le 30 septembre 2020

**Médiateurs lipidiques de l'inflammation et populations
lymphocytaires au cours des infections à Pneumocystis :
Etudes cliniques et modèle murin**

Ecole doctorale : **BSB - Biologie, Santé, Biotechnologies**

Spécialité : **MICROBIOLOGIE**

Unité de recherche :

CPTP - Centre de Physiopathologie de Toulouse Purpan

Thèse dirigée par
Xavier IRIART

Jury

Mme Laurence Delhaes, Rapporteur
M. Pierre Duffau, Rapporteur
Mme Magali Chabé, Rapporteur
M. Antoine Berry, Président du jury
M. Xavier Iriart, Directeur de thèse
M. Marc Dubourdeau, Invité

Résumé

La pneumocystose (PCP) est une pneumonie interstitielle opportuniste due au champignon *Pneumocystis jirovecii*. Au cours de cette maladie, les lésions pulmonaires sont davantage liées à une réponse inflammatoire excessive de l'hôte, qu'à une action cytopathogène directe du champignon. Les lymphocytes dont les T CD4 sont des cellules clés de la réponse immune contre *P. jirovecii*. Néanmoins, les connaissances restent limitées sur le rôle spécifique des sous-populations lymphocytaires au cours de la PCP. Par ailleurs, les lipides pro-inflammatoires et pro-résolutifs de l'inflammation (SPM) ont été très peu étudiés dans le cadre de la PCP. Ce travail de thèse avait pour objectif d'étudier les réponses lymphocytaires et les réponses lipidiques pro-inflammatoires et pro-résolutives au cours de la PCP grâce à deux études cliniques et une étude expérimentale sur modèle murin. La première étude clinique, réalisée chez des patients immunodéprimés atteints ou non de PCP, a montré un taux de lymphocytes B (LB) sanguins plus fréquemment abaissé chez les sujets infectés. Chez les patients atteints de PCP, le ratio Th1/Th2 était significativement abaissé (Th1 sanguins diminués et Th2 augmentés) chez les patients décédés. Ceci était associé à une diminution des T CD8 cytotoxiques et des cellules NK chez les patients décédés. La 2^{ème} étude sur modèle murin a mis en évidence une réponse immune différente à *P. murina* en fonction du statut immunitaire de l'hôte, en particulier la formation de structures iBALT (induced Bronchus-associated lymphoid tissue) regroupant des macrophages, des LB et lymphocytes T probablement CD4 Tfh chez les souris immunocompétentes mais absentes chez les souris immunodéprimées. En cas d'immunodépression, les différents profils de T CD4 helper étaient tous augmentés au pic de l'infection. Le dosage des lipides a montré l'implication de la prostaglandine E2 (PGE2) dans la physiopathologie de l'infection à *P. murina*, notamment pour les souris immunodéprimées qui avaient une concentration plus élevée en PGE2 au pic de l'infection. Ceci était accompagné d'une augmentation globale des SPMs, qui étaient au contraire peu modifiés chez les souris immunocompétentes. Un enrichissement du régime lipidique en oméga 6 améliorait l'évolution de la maladie, en association avec une diminution de la PGE2, une diminution globale des SPMs et une augmentation du ratio Th1/Th2. La PGE2 est connue pour inhiber la réponse Th1 et induire la production de SPMs, eux même inhibiteurs de la réponse Th1. Elle pourrait ainsi représenter un élément important dans la physiopathologie de la PCP. L'étude des lipides chez l'Homme a confirmé l'intérêt de la PGE2 dans la maladie car cet eicosanoïde était plus élevé chez les patients évoluant défavorablement, en lien avec une réponse Th1 diminuée et certains SPM plus élevés. Les patients évoluant défavorablement avaient aussi des acides gras oméga 6 totaux diminués et des acides gras oméga 9 augmentés par rapport aux patients évoluant favorablement. En conclusion, l'ensemble des données obtenues à partir des études cliniques et du modèle murin est en faveur de la coexistence de deux réponses à une infection par *Pneumocystis*, selon le statut immunitaire de l'hôte. Les réponses

Tfh et LB semblent être majoritaires chez un hôte immunocompétent au sein de formations iBALT. A l'inverse, chez les hôtes immunodéprimés, en l'absence de T CD4 et/ou de LB, une réponse Th1/Tc1 pourrait être bénéfique pour l'élimination du champignon. La PGE2 qui oriente l'immunité de l'hôte vers une réponse Th2 et la résolution de l'inflammation pourrait s'opposer à la bonne élimination de *Pneumocystis* dans un contexte d'immunodépression. Des études complémentaires seront nécessaires afin de comprendre ces mécanismes et l'effet de l'apport nutritionnel en lipides, notamment en oméga 6. L'intérêt de la PGE2, des T CD4 Th1 et des T CD8 cytotoxiques en tant que marqueurs pronostiques de la PCP devra être confirmé à plus large échelle.

Mots clés : *Pneumocystis*, Inflammation, Champignon, Pro-résolutif, Lipides, Lymphocytes

Abstract

Pneumocystis pneumonia (PCP) is an opportunistic interstitial pneumonia caused by the fungus *Pneumocystis jirovecii*. In this disease, lung lesions are more related to an excessive inflammatory response of the host than to a direct cytopathogenic action of the fungus. Lymphocytes including CD4 T cells are key cells in the immune response against *P. jirovecii*. Nevertheless, knowledge remains limited on the specific role of lymphocyte subpopulations during PCP. In addition, pro-inflammatory and pro-resolving lipid mediators (SPMs) have been very little studied in PCP. The objective of this thesis work was to study lymphocyte responses, pro-inflammatory and pro-resolving lipid mediators during PCP through two clinical studies and an experimental mouse model study. The first clinical study, conducted in immunocompromised patients with and without PCP, showed that the levels of peripheral blood B cells (LB) were more frequently lowered in infected subjects. On the other hand, in patients diagnosed with PCP, the Th1/Th2 ratio was significantly reduced (Th1 decreased and Th2 increased) in deceased patients. This was associated with a decrease in cytotoxic CD8 T cells and in NK cells in the deceased patients. The second study, on a mouse model, demonstrated a different immune response to *P. murina* depending on the immune status of the host. Notably, the formation of an iBALT (induced Bronchus-associated lymphoid tissue) that included macrophages, LB and probably CD4+ follicular helper (Tfh) cells was observed in immunocompetent mice but was absent in immunocompromised mice. In immunosuppressed mice, the different CD4 T helper profiles were all increased at the peak of infection. Lipid assay showed the involvement of prostaglandin E2 (PGE2) in the pathophysiology of *P. murina* infection, particularly in immunosuppressed mice that had a higher PGE2 concentration at the peak of infection. This was accompanied by an overall increase in SPMs, which were poorly modified in immunocompetent mice. An enrichment of the lipid diet with omega 6 fatty acids improved the disease progression, in association with a decrease in PGE2, an overall decrease in SPMs and an increase in the Th1/Th2 ratio. PGE2 is known to inhibit the Th1 response and induce the production of SPMs, which themselves inhibit the Th1 response. PGE2 may thus represent an important element in the pathophysiology of PCP. The study of lipids in humans has confirmed the interest of PGE2 in the disease because this eicosanoid was higher in patients with an unfavorable progression, in connection with a decreased Th1 response and some higher SPMs concentrations. Patients with an unfavorable evolution also had decreased total omega-6 fatty acids and increased omega-9 fatty acids compared to patients with a favorable evolution. In conclusion, all the data obtained from the clinical studies and the mouse model support the coexistence of two responses to *Pneumocystis* infection, depending on the immune status of the host. LB and Tfh cells appear to be the two major types of lymphocytes in the lungs of infected immunocompetent hosts, organized within iBALT formations. Conversely, in immunocompromised hosts, in the absence of CD4 T and/or LB, a

Th1/Tc1 response may be beneficial for the elimination of the fungus. PGE2, which directs host immunity towards a Th2 response and resolution of inflammation, could thus hinder the elimination of *Pneumocystis* in an immunocompromised context. Further studies will be necessary to understand these mechanisms and the effect of lipid dietary intake, particularly of omega 6 fatty acids. The interest of PGE2, Th1 CD4 T cells and cytotoxic CD8 T cells as prognostic markers of PCP will need to be confirmed on a wider scale.

Keywords : *Pneumocystis*, Inflammation, Fungus, Pro-resolving, Lipids, lymphocytes

Remerciements

À Madame le Pr Laurence Delhaes, merci d'avoir accepté de juger ce travail et pour ce que vous pourrez lui apporter par vos connaissances sur *Pneumocystis* et sur les infections fongiques pulmonaires en général. Merci également pour votre gentillesse et pour votre intérêt dans mon parcours dans le milieu de la Parasitologie Mycologie.

À Madame le Dr Magali Chabé, merci d'avoir accepté de juger ce travail et pour ce que vous pourrez lui apporter par vos connaissances sur ce champignon et notamment sur le modèle murin.

À Monsieur le Pr Pierre Duffau, merci d'avoir accepté de juger ce travail et pour ce que vous pourrez lui apporter par votre expérience clinique et votre expertise immunologique.

À Monsieur le Pr Antoine Berry, merci d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse. Merci de m'avoir accueillie au sein de ton laboratoire et de ton équipe si chaleureuse, il y a maintenant plus de trois ans. Merci pour tes conseils et pour ton aide bienveillante tout au long de ce travail.

À Monsieur le Dr Marc Dubourdeau, merci d'avoir accepté de participer au jury de cette thèse, à laquelle ton équipe et toi-même avez beaucoup participé. Merci pour ce que tu as apporté à ce travail par ton expertise sur ce domaine très spécifique qui est celui des lipides pro-résolutifs de l'inflammation.

À Monsieur le Dr Xavier Iriart, merci d'avoir assuré la direction de cette thèse comme un chef, en espérant que cette expérience t'aura donné envie de poursuivre l'encadrement de thèses d'Université. Merci pour ta gentillesse, pour ton écoute et pour la confiance que tu m'as accordée tout au long de cette thèse. Merci d'avoir vécu avec moi toutes ces aventures sur *Pneumocystis*, qui trouve petit à petit sa place dans le cœur des parasitologues de l'équipe EIPIC. C'était un plaisir de travailler avec toi pour cette thèse et au quotidien dans le laboratoire de Parasitologie Mycologie.

À tous ceux qui ont participé à ce projet :

À Catherine Marques et Sandie Ménard, un énorme merci pour l'aide précieuse et le soutien que vous m'avez apportés durant tout ce projet et ce, toujours avec le sourire et même devrais-je dire avec de nombreux éclats de rire. J'ai eu une chance folle de faire cette thèse avec deux femmes si investies, consciencieuses, généreuses et bienveillantes. Ces trois ans de thèse n'auraient jamais été les mêmes sans vous et je vous en suis pour toujours reconnaissante. Je ne garde que de bons souvenirs de ces longues longues heures passées ensemble en manip (dont certaines dans le noir, éclairées à la lumière de nos téléphones) et ce n'est pas un mince exploit !

À Catherine M, un merci spécial pour tous ces blind tests, le mcdo express à 23h, de m'avoir fait redécouvrir (un peu trop même) M. Pokora, Soprano, Maluma et Cricri ! Merci pour ta persévérance devant Flowjo et Graphpad. A nous deux, on y est arrivées !

À Sandie, un merci spécial pour tous ces moments en A2, à préparer des biberons, à encourager nos souris et à étudier leurs queues après 11h de manip. Tu es vraiment une formatrice hors-pair et j'espère que tu réaliseras un jour à quel point tu nous impressionnes tous!

À l'équipe d'Ambiotis, et principalement Marc, Gérald et Vincent, pour votre participation à ce projet et pour ce que vous avez apporté à ce travail grâce à votre expertise dans le domaine des médiateurs lipidiques de l'inflammation.

À Sylvie Caspar, merci pour ta participation à ce projet, pour tous tes conseils et pour les discussions sur les lipides. Merci également aux techniciennes du service de Biochimie nutritionnelle pour leur aide dans le dosage des acides gras précurseurs des médiateurs lipidiques.

À Boualem Sendid, merci d'avoir accepté de participer à l'étude clinique INFLA PCP en réalisant le dosage des Beta D glucanes plasmatiques.

À Charline Daguzan, merci pour vos conseils et votre aide précieuse pour l'initiation et le déroulement de l'étude clinique INFLA PCP.

Aux investigateurs associés de l'étude clinique INFLA-PCP, merci pour votre participation importante à l'étude clinique, sans laquelle rien n'aurait été possible.

Aux patients du CHU de Toulouse, qui nous ont fait confiance et ont accepté de participer aux études cliniques.

À Nicolas Blanchard et à toute l'équipe EIPIC, passée ou présente, Emilie B., Marcy, Aurore, Anna, Ali, Emilie G., Rémi, Amel, Frédérick. Merci pour toutes les discussions qui m'ont fait avancer, ainsi que le projet. Merci également pour votre accueil et pour tous ces bons moments ensemble.

Merci Nicolas pour tous tes conseils qui ont fait évoluer ce projet durant ces trois années de travail. Merci pour tes encouragements et ton suivi toujours bienveillant de ce travail. Merci **Emilie B.** de m'avoir permis de dépasser ma réticence initiale envers les souris et d'avoir partagé avec moi au quotidien tes post-its Star Wars ! Merci **Marcy** pour ta bonne humeur continue et pour tes conseils tout au long de ce projet. Merci **Aurore** pour tes « peut-être » et pour toutes ces pannes de Fortessa, de Flowjo, sans oublier la météo pluvieuse qu'on te doit (merci également pour ton humour et ta gentillesse). Merci **Ali** pour ton aide concernant la prise de recul et pour ton bon goût incontestable pour les prénoms féminins. Merci **Anna** de m'avoir fait comprendre plus d'une chose sur le parcours de thésarde et pour ton écoute. Merci **Emilie G.** pour toutes ces discussions sur la recherche en Parasitologie ou plutôt « Gossip girl » et pour ta gentillesse.

À l'équipe du Service de Parasitologie Mycologie du CHU de Toulouse :

Aux biologistes, Antoine, Xavier, Judith, Sophie, Pamela, Alexis, Christine et Catherine A.: merci pour votre accueil et pour votre gentillesse pendant ces presque quatre années passées avec vous. Vous êtes une équipe soudée, chaleureuse qui mérite vraiment son surnom de Bisounours. Une équipe très humaine et qui forme une vraie petite famille. Vous êtes aussi une équipe très compétente, avec qui j'ai beaucoup appris et qui m'a conforté dans mon envie de travailler en Parasitologie-Mycologie. Merci enfin d'avoir été attentifs au déroulement de cette thèse et compréhensifs quant à mes nombreux aller-retours entre l'INSERM et l'Hôpital.

Un merci spécial à Judith, ma coloc de bureau, merci de m'avoir supporté ces quatre années, notamment quand je passais des heures avec le scotch sur mon cahier de manip. Merci de m'avoir fourni en à peu près toutes les fournitures de bureau (même un trombone géant), de m'avoir dépannée pour tous les problèmes informatiques, statistiques et j'en passe... Et surtout merci pour ton écoute et ta gentillesse. Je n'aurais changé de bureau pour rien au monde (malgré les quelques difficultés de volet)!

À Pamela, ma voisine de couloir, merci pour toutes ces discussions professionnelles ou personnelles, dans le même bureau ou à travers un couloir. Merci pour tous ces rires et toutes ces réunions « râlage » et toutes ces aventures parisiennes. Merci pour ces discussions sur nos compagnons geeks. J'ai hâte de rencontrer le petit Kirikou!

À Sophie, merci pour ta gentillesse et ton écoute, notamment lors de nos réunions à trois avec Pamela. Merci pour tous ces bons souvenirs en duo en congrès à Nice ou à Belgrade. Et merci pour tout ce que tu m'as appris sur la Mycologie clinique.

À Catherine A, merci pour toutes ces heures de partage devant les dossiers de sérologie toxoplasmose, et surtout devant les procédures. Merci pour ces pauses goûter « débriefing » qui me manquent déjà. J'espère qu'on pourra poursuivre nos aventures dans notre prochaine ville d'accueil !

À Alexis, merci pour tous tes conseils sur le parcours en Parasitologie et sur le déroulé de cette thèse. Merci pour nos discussions animées à l'internat et pour ces débats avec Pamela.

Aux techniciens de laboratoire des secteurs de Biologie moléculaire, Sérologie et Morphologie:

Merci à vous pour ces moments passés ensemble, pour votre accueil bienveillant et ce partage de connaissances. Vous participez grandement au surnom du laboratoire des Bisounours.

Un grand merci spécifique aux techniciens de biologie moléculaire, Elodie, Valérie, Julie et Allan, pour m'avoir avertie des résultats des PCR *Pneumocystis* quotidiennement pendant deux ans, contre vents et marées! Je vous en suis très reconnaissante!

À Claudine et Muriel, merci pour votre aide au quotidien et pour ces discussions films, série, voyage, animaux.

Au groupe des AHU et anciens AHU, Pauline, Clémence, Chloé, Charlène et David et Hélène: merci pour votre soutien et pour toutes ces belles soirées passées ensemble. J'inclus aussi les AHU rennais !

Un merci spécial à mes co-escape gameuses, Pauline, Clémence, Catherine A, Judith et Sandie : merci pour toutes ces belles victoires (je ne retiens que celles-là), terminées à plat ventre sur le fil ou plus à la verticale avec quelques minutes d'avance !

À Chich, Junior, Alexandra, Lavalito, Michael, Laurence, Claire, Nellz, Sam, Sand, Michelle, Caroline, Aurélie et Dany, merci pour votre soutien, pour tous ces moments partagés depuis nos rencontres et à tous ceux qui viendront encore.

À ma famille, merci pour votre soutien, pour votre amour et pour tous ces beaux moments partagés ensemble.

À Papa, Maman, Fanny, Mathias et petit Georgio, merci pour votre soutien sans faille et pour votre écoute et vos conseils au quotidien. Je n'aurais jamais pu arriver jusque-là sans vous. Merci pour votre intérêt dans ce travail, qui n'est pas forcément le plus attrayant pour vous (surtout Georgio !). Vous êtes mon roc et tous les moments passés ensemble me donnent de la force. J'espère vous rendre fiers et vous donner tout l'amour que vous méritez !

À Alexandre, comme je te l'avais promis je te remercie pour le proofreading! Mais surtout je te remercie d'être toujours là pour moi, en face à face, par mail, par whatsapp ou par skype. Merci de m'avoir soutenu encore une fois durant tout ce travail, d'autant plus avec les conditions spéciales du confinement. Même si tu restes le gagnant de notre couple, je me sens très chanceuse d'avoir pu partager avec toi ces dix dernières années et de pouvoir vivre ensemble nos nombreuses futures aventures !

Sommaire

Résumé	1
Abstract	3
Remerciements	5
Liste des figures	13
Liste des Tableaux	14
Liste des abréviations :	15
Contexte de réalisation de ce travail de Thèse	16
Introduction	17
Partie I : Synthèse Bibliographique	19
I. <i>Pneumocystis jirovecii</i> et la pneumocystose	19
I.1. Découverte, classification et pathophysiologie de <i>Pneumocystis</i>	19
I.1.a. Découverte du genre <i>Pneumocystis</i>	19
I.1.b. Reclassification taxonomique du genre <i>Pneumocystis</i>	19
I.1.c. Spécificité d'espèce et changement de nomenclature	20
I.1.d. Un parasitisme obligatoire	21
I.1.e. Morphologie de <i>Pneumocystis</i>	21
I.1.f. Le Cycle de <i>Pneumocystis</i> spp.	22
I.1.g. Transmission de <i>Pneumocystis</i> spp.	23
I.2. Pneumocystose – présentations clinique et radiologique	24
I.2.a. Présentation clinique	24
I.2.b. Différences cliniques selon les types d'immunodépression	24
I.2.c. Présentation radiologique	25
I.3. Epidémiologie de <i>Pneumocystis jirovecii</i> et de la pneumocystose	26
I.3.a. Fréquence de contacts avec <i>Pneumocystis jirovecii</i>	26
I.3.b. Latence ou infection <i>de novo</i> ?	26
I.3.c. Epidémiologie de la pneumocystose	27
I.3.d. Facteurs de risques de PCP	27
I.3.e. Facteurs de risques de mortalité	29
I.4. Le diagnostic biologique de la PCP	30
I.4.a. Les prélèvements respiratoires	30
I.4.b. L'examen microscopique	30

I.4.c. La recherche moléculaire _____	32
I.4.d. Dosage de marqueurs sérologiques _____	32
I.5. Traitement et prophylaxie de la PCP _____	33
I.5.a. Traitement étiologique de la pneumocystose _____	33
I.5.b. Adjonction de corticoïdes _____	34
I.5.c. Prophylaxie anti- <i>Pneumocystis</i> _____	34
I.6. Le rôle de l'inflammation au cours de la pneumocystose _____	35
I.7. Modèle murin de la pneumocystose _____	36
II. Régulation et résolution de l'inflammation _____	37
II.1. La résolution de l'inflammation : nouveau paradigme de l'inflammation _____	37
II.1.a. Définitions de l'inflammation _____	37
II.2.b. Effets délétères de l'inflammation _____	38
II.2.c. La résolution de l'inflammation : nouveau paradigme de l'inflammation _____	39
II.2.d. Molécules anti-inflammatoires et pro-résolutifs de l'inflammation _____	41
II.2. Lymphocytes T CD4 helper, T CD4 régulateurs et contrôle de l'inflammation _____	42
II.2.a. Profils Th1, Th2 et Th17 des lymphocytes T CD4 helpers _____	42
II.2.b. Lymphocytes T régulateurs _____	44
II.2.c. Equilibre des lymphocytes T helper et de la balance pro/anti inflammatoire _____	45
II.2.d. La régulation de la réaction inflammatoire par les lymphocytes T CD4 _____	47
II.3. Lipides de résolution de l'inflammation _____	48
II.3.a. Les 4 familles de lipides pro-résolutifs de l'inflammation _____	48
II.3.b. Métabolisme des lipides de résolution de l'inflammation _____	48
II.3.c. Mode d'action des lipides de résolution de l'inflammation _____	51
II.3.d. Lipides de résolution de l'inflammation et infections _____	52
II.3.e. Influence des substances exogènes sur la résolution de l'inflammation _____	53
III. La physiopathologie inflammatoire de la pneumocystose pulmonaire _____	55
III.1. Réponse immune physiologique chez un sujet immunocompétent _____	55
III.1.a. Stimulation des cellules résidentes et chémoattraction des leucocytes _____	56
III.1.b. Afflux des leucocytes dans les poumons _____	56
III.1.c. Réponse immune lymphocytaire _____	57
III.1.d. Elimination de <i>Pneumocystis sp</i> par phagocytose et activité cytotoxique _____	58
III.1.e. Résolution de l'inflammation _____	59
III.2. Etude des déficits immunitaires à risque de pneumocystose : Identification des cellules essentielles pour l'élimination du champignon _____	60
III.2.a. Déficits concernant les lymphocytes T CD4 _____	60
III.2.b. Déficits concernant les lymphocytes B _____	61
III.2.c. Déficits concernant les lymphocytes T CD8 _____	62

III.2.d. Déficits concernant les polynucléaires neutrophiles _____	62
III.2.e. Déficits concernant les macrophages _____	63
III.2.f. Déficit concernant les lymphocytes NK _____	64
III.2.h. Déficit concernant les polynucléaires éosinophiles _____	64
III.3. Immunité cellulaire au cours de la pneumocystose _____	66
III.3.a Infiltration pulmonaire cellulaire au cours d'une pneumocystose _____	66
III.3.b. Lymphocytes T _____	67
III.3.c. Lymphocytes T CD4 _____	68
III.3.d. Lymphocytes T CD8 et réponse cytotoxique _____	69
III.3.e. Réponse humorale _____	70
III.3.f. Macrophages _____	70
III.3.g. Polynucléaires neutrophiles _____	71
III.3.h. Polynucléaires éosinophiles _____	71
III.4. Lipides de l'inflammation au cours de la pneumocystose _____	73
III.4.a. Lipides pro-inflammatoires _____	73
III.4.b. Lipides pro-résolutifs de l'inflammation (SPM) _____	73
Objectifs _____	74
Partie 2 : Travaux de recherche _____	75
Article 1: Identification de facteurs de risque de Pneumocystose sévère par immunophénotypage des lymphocytes sanguins périphériques chez l'Homme _____	76
Conclusion et perspectives de l'article 1 _____	99
Article 2 : Différentes réponses inflammatoires à une infection par <i>Pneumocystis murina</i> en fonction du statut immunitaire de l'hôte : implication des cellules immunes, des lipides pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. _____	101
Conclusions et perspectives de l'article 2 _____	137
Article 3 : Impact des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires et pro-résolutifs sur la sévérité et l'évolution de la pneumocystose à <i>P. jirovecii</i> _____	138
Conclusion de l'article 3 _____	169
Conclusion générale _____	170
Perspectives _____	175
Références _____	177

Liste des figures

Figure 1: classification phylogénétique du genre <i>Pneumocystis</i> _____	20
Figure 2: Trophozoïtes et kystes de <i>Pneumocystis</i> spp. observés par microscopie électronique _____	22
Figure 3: Cycle putatif de <i>Pneumocystis</i> sp. <i>Pneumocystis</i> workshop: 10th anniversary summary _____	23
Figure 4: Participation des hôtes immunocompétents à la transmission de <i>Pneumocystis</i> sp. _____	24
Figure 5: Exemples d'images caractéristiques observées au scanner lors d'une PCP, selon le type d'immunodépression. _____	25
Figure 6: Prévalence et mortalité de la PCP en fonction des autres infections fongiques invasives _____	27
Figure 7 :: Traitements immunosuppresseurs ou immunomodulateurs associés à un risque accru de PCP _____	29
Figure 8: Observation microscopique de kystes et trophozoïtes de <i>P. jirovecii</i> _____	31
Figure 9: Arbre décisionnel proposé par Damiani C et al. pour le diagnostic de la PCP en fonction des BDG et de la qPCR (2013) _____	33
Figure 10: Inflammation péribronchique et périvasculaire observées au cours de la PCP chez le rat _____	35
Figure 11: Origine et Rôle physiologique de l'inflammation _____	39
Figure 12: Modèle actuel de la résolution de l'inflammation. _____	40
Figure 13: Trois phases successives de l'inflammation : Initiation, Résolution et Post-résolution _____	41
Figure 14: Effet des molécules anti-inflammatoires vs effet des molécules pro-résolutives de l'inflammation _____	42
Figure 15: Caractéristiques et différenciation des lymphocytes TCD4 helper et TCD4 régulateurs _____	44
Figure 16: Populations T CD4 helper et T CD4 régulateurs dans l'équilibre pro/anti-inflammatoire _____	45
Figure 17: Effets antagonistes des réponses Th1 et Th2 sur les fibres de collagène _____	46
Figure 18: Effets régulateurs entre populations T CD4 helper et T régulateurs _____	47
Figure 19: Voies enzymatiques impliquées dans la synthèse des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires et pro-résolutifs de l'inflammation _____	50
Figure 20: Switch lipidique au cours de l'inflammation _____	51
Figure 21: Mode d'action et effet de différents composés lipidiques pro-résolutifs de l'inflammation _____	52
Figure 22: Effets des lipides pro-résolutifs de l'inflammation sur divers modèles infectieux _____	53
Figure 23: Réponse immune d'une souris immunocompétente à la suite d'une infection par <i>P. murina</i> _____	57
Figure 24: Augmentation des populations T CD4 Th1 et Th2 chez des souris infectées par <i>Pneumocystis</i> dans les poumons et les ganglions. _____	58
Figure 25: Phagocytose d'un kyste de <i>P. carinii</i> par un macrophage de rat, observée par microscopie électronique. _____	59
Figure 26: Effets de la déplétion en IL-10 sur l'inflammation pulmonaire chez des souris infectées par <i>P. murina</i> _____	61
Figure 27: Schéma putatif de la réponse immune lors d'une infection par <i>Pneumocystis</i> sp. (D'après Otieno-Odhiambo et al., 2019) (250) _____	65

Figure 28: Infiltration cellulaire pulmonaire au cours du temps chez des souris immunocompétentes et immunodéprimées (déplétion en T CD4) infectées par P. murina _____ 67

Figure 29 : Modèle hypothétique des réponses immunes au cours de la pneumocystose chez l'hôte immunocompétent et chez l'hôte immunodéprimé _____ 173

Liste des Tableaux

Tableau 1: Implication des cellules immunitaires dans la réponse immune physiologique anti-Pneumocystis __ 65

Tableau 2: Effet des différentes cellules immunitaires sur la charge fongique et sur l'inflammation pulmonaire au cours de la PCP. _____ 72

Liste des abréviations :

ARA : acide arachidonique	NK cells : Natural killer cells
Ac : anticorps	PAMPs : pathogens-associated molecular patterns
ADN : acide désoxyribonucléique	PaO ₂ : pression partielle d'oxygène
AGPI : acide gras polyinsaturés	PCP : pneumocystose pulmonaire
ARN : acide ribonucléique	PCR : « polymerase chain reaction » ou réaction de polymérisation en chaîne
BPCO : broncho-pneumopathie chronique obstructive	PGD ₂ : prostaglandine D ₂
BDG : β-D-glucanes	PGE ₂ : prostaglandine E ₂
CPA : cellules présentatrices d'antigène	PLA ₂ : phospholipase A ₂
CMH : complexe majeur d'histocompatibilité	PNE : polynucléaire basophile
CMV : <i>cytomégalo</i> virus	PNN : polynucléaire neutrophile
Ct : « cycle threshold » ou cycle seuil de détection	PPAR : peroxisome proliferator activated receptor
DAMPs : damage-associated molecules patterns	PRR : pattern recognition receptor
DHA : acide docosahexaénoïque	ROS : reactive oxygen species
EPA : acide eicosapentaénoïque	RVD1: résolvine D ₁
FoxP3 : Forkhead box P3	SCID : déficit immunitaire combine sévère
GATA-3 : Trans-acting T-cell-specific transcription factor	SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
GLA : acide gamma-linoléique	SPM : specialized proresolving mediators
IFN : interféron	T CD ₄ : lymphocyte T CD ₄
IL : interleukine	T CD ₈ : lymphocyte T CD ₈
LB : lymphocyte B	TCR : T-cell receptor
LBA : liquide de lavage broncho-alvéolaire	Tfh : lymphocyte T folliculaire helper
LDH : lactate déshydrogénase	TNF : tumor necrosis factor
LT : lymphocyte T	Treg : lymphocyte T régulateur
MGG : May-Grünwald Giemsa	TLR : Toll-like receptor
NF-κB : nuclear factor-kappa B	VIH : virus de l'immunodéficience humain

Contexte de réalisation de ce travail de Thèse

Ces travaux de thèse ont été réalisés dans le cadre d'un assistantat Hospitalo-Universitaire, au sein du service de Parasitologie-Mycoologie du CHU de Toulouse, dirigé par le Pr Antoine Berry, et de l'équipe « Parasites eucaryotes intracellulaires: immunité et chimiorésistance », dirigée par le Dr Nicolas Blanchard (Centre de Physiopathologie de Toulouse-Purpan, UMR1043 Inserm-CNRS-Université de Toulouse).

Ce travail a été réalisé en collaborations avec :

- l'entreprise Ambiotis SAS à Toulouse (dirigée par le Dr Marc Dubourdeau) pour le dosage des médiateurs lipidiques de l'inflammation
- le service de Biochimie clinique et principalement le Dr Sylvie Caspar, pour le dosage des acides gras précurseurs des médiateurs lipidiques de l'inflammation
- le service de Parasitologie-Mycoologie du CHU de Lille, dirigé par le Pr Boualem Sendid, pour le dosage des Beta-D-glucanes.

Introduction

Plus de 100 ans après la première description de *Pneumocystis*, les connaissances sur le champignon ont beaucoup progressé. Ce micro-organisme, au départ identifié comme un parasite protozoaire et désigné *Pneumocystis carinii* est ainsi devenu au fil des années et de l'évolution des connaissances, un champignon rebaptisé *Pneumocystis jirovecii* chez l'Homme (1). Néanmoins, l'impossibilité de le cultiver *in vitro* limite et ralentit les progrès de compréhension, notamment sur la physiopathologie de la maladie.

Au cours du siècle écoulé, la pneumonie à *Pneumocystis jirovecii*, autrement appelée pneumocystose, a pris de l'importance dans le domaine médical, d'abord avec l'arrivée du syndrome d'immunodéficience acquise dans les années 1980, puis avec le nombre croissant de patients immunodéprimés à risque de développer la maladie, en lien avec les progrès de la médecine moderne. La pneumocystose représente désormais la deuxième ou troisième infection fongique invasive la plus fréquente en France, selon les études (2,3). Malgré l'efficacité du diagnostic moléculaire et du traitement par cotrimoxazole, la mortalité de la pneumocystose reste élevée, entre 20 et 30% (3).

Paradoxalement, cette maladie opportuniste qui se déclenche chez le patient immunodéprimé est due à une réponse immune excessive (4,5). Celle-ci entraîne une dégradation du tissu alvéolaire de l'hôte infecté, provoquant ainsi la dyspnée caractéristique de la maladie. L'adjonction d'une corticothérapie au traitement antimicrobien chez les patients atteints de pneumocystose s'est montrée efficace dans les formes sévères de pneumocystose chez les patients infectés par le VIH (6). Toutefois, cette immunomodulation par les corticoïdes n'a pas démontré son efficacité chez les patients immunodéprimés séronégatifs pour le VIH, qui sont les plus à risque de développer une pneumocystose sévère (7). Une meilleure compréhension des mécanismes inflammatoires mis en jeu lors de la pneumocystose semble ainsi primordiale afin d'en améliorer la prise en charge et le pronostic.

L'importance des cellules T CD4 au cours de la maladie est bien démontrée à l'heure actuelle, constituant les chefs d'orchestre de la réponse immunitaire adaptative (8,9). Cependant, l'orientation de la réponse immune des T CD4 favorable au contrôle et à la bonne évolution de la maladie reste indéterminée (4). Par ailleurs, les éléments lipidiques de la réponse immune n'ont pas ou peu été étudiés au cours de la maladie. Pourtant, le processus actif de résolution de l'inflammation, découvert récemment et porté par les lipides pro-résolutifs de l'inflammation (10) pourrait avoir un rôle dans la limitation de cette réponse immune excessive et incontrôlée, observée au cours de la pneumocystose.

Les objectifs de ce travail de thèse sont a) de mieux comprendre le rôle des différentes sous-populations lymphocytaires, et notamment des sous-populations de T CD4 dans la pneumocystose, b) de décrire pour la première fois l'évolution des lipides pro-résolutifs de l'inflammation au cours de l'infection à *Pneumocystis* en conditions physiologiques et pathologiques.

Ce manuscrit est composé d'une première partie de revue bibliographique, revenant successivement sur le champignon *Pneumocystis* et la pneumocystose pulmonaire, sur les éléments cellulaires et lipidiques associés au processus inflammatoire, et enfin sur les connaissances actuelles de la réponse inflammatoire au cours d'une infection par *Pneumocystis sp.* Cette revue bibliographie introduit les trois articles issus des expériences menées durant cette thèse. Le premier article est une étude clinique qui se focalise sur la réponse lymphocytaire au cours de la pneumocystose. Le second article décrit la réponse immune cellulaire et lipidique observée chez des souris immunodéprimées et immunocompétentes, infectées par *P. murina*. Enfin, le dernier article est une seconde étude clinique qui se concentre cette fois sur le rôle des molécules lipidiques de l'inflammation au cours de la maladie.

Partie I : Synthèse Bibliographique

I. *Pneumocystis jirovecii* et la pneumocystose

I.1. Découverte, classification et pathophysiologie de *Pneumocystis*

I.1.a. Découverte du genre *Pneumocystis*

Le genre *Pneumocystis* a été découvert au début du XX^{ème} siècle. Depuis sa première description, sa classification et son nom ont évolué progressivement avec l'amélioration de nos connaissances sur le micro-organisme.

Carlos Chagas et Antonio *Carinii* ont été les premiers à avoir observé *Pneumocystis* dans les poumons de cochons d'inde et de rats au Brésil, en 1909 et en 1910, respectivement. Cependant, ils ont d'abord associé la forme kystique observée à un nouveau stade parasitaire de *Trypanosoma cruzi*. Antonio *Carinii* a envoyé les tissus incriminés à l'Institut Pasteur de Paris, au Pr Laveran. Les assistants de ce dernier, les époux Delanoë, ont alors pu faire le lien avec des formes comparables présentes dans les poumons de rats d'égouts parisiens, permettant ainsi d'exclure qu'il s'agisse d'une nouvelle forme de *Trypanosoma*. Ce nouveau micro-organisme pulmonaire, à la morphologie kystique, est nommé *Pneumocystis carinii* (11). Il est d'abord classé parmi les parasites protozoaires, d'après les caractéristiques liées à sa morphologie, notamment kystique, de son cycle biphasique au sein de l'hôte infecté et de l'efficacité des traitements anti-protozoaires quand les traitements antifongiques étaient inefficaces (1).

Ce n'est qu'au cours de la seconde guerre mondiale, que le parasitologue tchèque Otto Jirovec a décrit chez des enfants dénutris une pneumopathie interstitielle opportuniste causée par *Pneumocystis*. Mais la pneumocystose (PCP) pulmonaire a pris une plus grande envergure en pathologie humaine avec l'arrivée du virus VIH, dans les années 1980. Une augmentation significative du nombre de cas de PCP chez des sujets jeunes sans facteurs de risque habituels a été observée, permettant de mettre en évidence la nouvelle épidémie virale (4).

I.1.b. Reclassification taxonomique du genre *Pneumocystis*

Malgré une première classification taxonomique dans le règne des protozoaires, pour les raisons citées précédemment, le champignon est finalement reclassé dans le règne des champignons dans les années

1990. Une analyse phylogénétique de l'ARN16S a montré une proximité plus importante du genre *Pneumocystis* avec les champignons Ascomycètes (12,13).

De façon plus précise, le genre *Pneumocystis* a été classé dans la division des Ascomycètes avec *Saccharomyces spp.* et dans la sous-division des Taphrinomycotina rassemblant de nombreux pathogènes de plantes. Il est le seul représentant de l'ordre des Pneumocystidomycetes.

La modification tardive de classification a pour conséquence une utilisation toujours importante de la terminologie parasitaire (kyste, trophozoïte) au lieu de la terminologie fongique (asque, ascospore) (14).

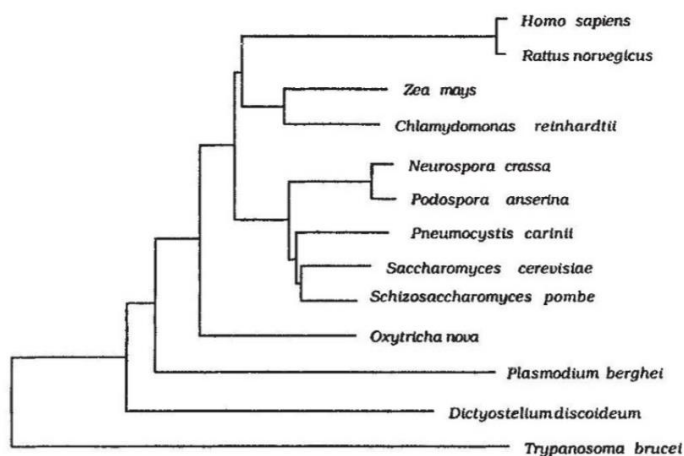


Figure 1: Classification phylogénétique du genre *Pneumocystis* (d'après Eddman et al. 1988) (12)

I.1.c. Spécificité d'espèce et changement de nomenclature

Pneumocystis spp. est un champignon infectant les mammifères. Il a été retrouvé dans les poumons de la plupart des mammifères dont des rongeurs, marsupiaux, chiens et primates. Dans les années 1990, une spécificité d'espèce a été démontrée entre le champignon et ses hôtes. En effet, une souche murine de *Pneumocystis* ne peut infecter un homme et inversement une espèce retrouvée chez l'homme ne peut être transmise aux souris ou aux rats (15,16).

Une nouvelle nomenclature a alors été mise en place afin d'attribuer un nom spécifique à chaque espèce de *Pneumocystis* selon son hôte. Le terme « *P. carinii* » est attribué à l'espèce infectant le rat en mémoire du découvreur de l'espèce chez le rat, tandis que l'espèce infectant l'humain a été nommée *P. jirovecii*, en hommage au parasitologue qui a découvert la pathologie chez l'Homme (1,17).

Parmi les autres espèces fréquemment étudiées, *Pneumocystis murina* est spécifique de la souris, *P. oryctolagi* est spécifique du lapin et *P. wakefieldiae* infecte les rats.

I.1d. Un parasitisme obligatoire

Pneumocystis se développe dans les poumons des hôtes mammifères qu'il infecte, préférentiellement au niveau alvéolaire. Il reste localisé au niveau extracellulaire mais a une interaction très importante avec les cellules de l'hôte, notamment les pneumocytes alvéolaires de type I en se fixant à des protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine et la vitronectine (18–20), ou avec les cellules des bronchioles *via* des récepteurs ICAM-1 (21).

L'analyse du génome de différentes espèces de *Pneumocystis* a montré l'absence de certaines voies enzymatiques notamment pour la synthèse des acides aminés (22–24). Ainsi, le champignon se procurerait les acides aminés de son hôte, ce qui implique une dépendance envers celui-ci. De plus, la spécificité étroite des espèces de *Pneumocystis* envers leurs hôtes évoque une co-évolution champignon / hôte, également en faveur d'un parasitisme obligatoire de *Pneumocystis*.

Les espèces de *Pneumocystis* ne pourraient donc se multiplier qu'au sein du tissu pulmonaire des mammifères avec lesquels elles ont co-évolué et n'auraient pas de réservoir environnemental. Les faibles traces d'ADN de *P. jirovecii* retrouvées dans l'air ou dans une eau stagnante ne semble pas constituer un réel réservoir mais correspondent probablement à du champignon excrété par des humains (25,26). Cette caractéristique de dépendance envers son hôte peut expliquer la difficulté de cultiver *Pneumocystis sp in vitro* sur des milieux classiques, comme cela est réalisable pour les autres champignons (23).

I.1.e. Morphologie de *Pneumocystis*

Les champignons du genre *Pneumocystis* sont des eucaryotes unicellulaires mesurant moins de 10µm. Les différentes espèces de *Pneumocystis* sont comparables du point de vue morphologique. Deux stades majeurs ont été décrits dans les alvéoles des Hommes ou animaux : le stade trophozoïte (forme végétative ou ascospore) et le stade kystique (ou asque).

Le stade trophozoïte est de forme amiboïde, mesure 2 à 8 µm et est uninuclé. Il est entouré d'une membrane cellulaire fine couverte de polysaccharides et peut émettre des projections cytoplasmiques, appelées *filapodia*, qui leur permet de s'attacher aux pneumocytes de type I. Le kyste a, quant à lui, une forme régulière ronde ou ovale. Il mesure 4 à 6µm et contient 8 corps intrakystiques individualisés qui ont chacun un noyau et leurs propres organites cellulaires. Le kyste possède également une paroi fongique épaisse, composée en grande partie de polysaccharide du type β-D glucanes (BDG) (27).

Il existe aussi des stades intermédiaires, appelés pré-kystes (précoce à tardif) dont la membrane extracellulaire va progressivement évoluer vers une paroi fongique. Ceux-ci contiennent 2 à 8 noyaux pas encore individualisés dans des corps intrakystiques.

Le stade trophozoïte serait le plus abondant (90-98%) dans les poumons des individus infectés, tandis que la forme kystique est la forme infectante (28,29).

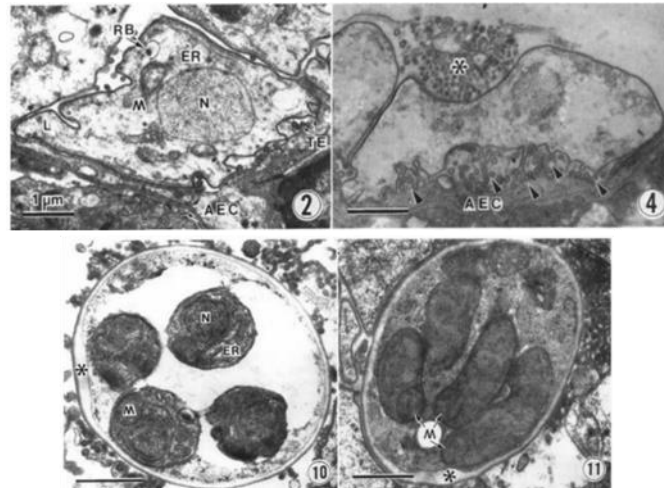


Figure 2: Trophozoïtes et kystes de *Pneumocystis* spp. observés par microscopie électronique (D'après Yoshida et al, 1989) (30)

1 : trophozoïte de *P. carinii*, 2 : trophozoïte de *P. carinii* attaché à une cellule épithéliale alvéolaire (AEC), 10 et 11 : pré-kystes de *Pneumocystis carinii* contenant quatre corps intra-kystiques.

I.1.f. Le Cycle de *Pneumocystis* spp.

Le cycle des champignons du genre *Pneumocystis* reste, à l'heure actuelle, putatif. Il pourrait comporter deux modes de multiplication distincts, comme observé pour d'autres champignons : un cycle asexué et un cycle sexué.

Le premier cycle, asexué, consisterait en la fission binaire d'un trophozoïte après un doublement du matériel génétique, comme le font les levures. A l'inverse, le cycle sexué résulterait de la fusion de deux formes trophozoïtes haploïdes qui aboutirait à un stade prékystique diploïde. Après deux méioses et une mitose, se formerait un kyste mature à 8 noyaux. Lors de la rupture du kyste mature, 8 ascospores (ou trophozoïtes) seraient libérées dans les poumons de l'individu infecté. Le kyste correspondrait ainsi à un stade transitoire apparaissant au cours du cycle sexué.

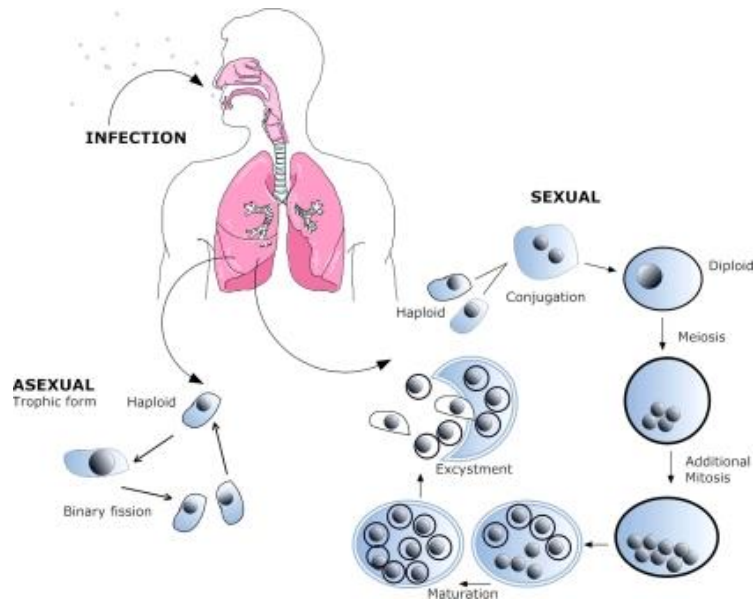


Figure 3: Cycle putatif de *Pneumocystis* sp. *Pneumocystis* workshop: 10th anniversary summary (D'après Beck et Cushion, 2009) (31)

Les observations par microscopie électronique de formes intermédiaires pré-kystiques à 2 ou 4 noyaux sont en faveur du cycle sexué, ainsi que la découverte récente de gènes impliqués dans l'homothallisme (32,33). La proportion de trophozoïtes 8 fois supérieure à celle des kystes vides suggère que ce mode de reproduction est très largement dominant. (34). De plus, un traitement par échinocandine (qui vise uniquement les formes kystiques) inhibe la prolifération du champignon, confirmant le rôle essentiel du cycle sexué pour la prolifération du champignon (29). Néanmoins le cycle asexué ne peut être exclu et pourrait se dérouler dans certaines conditions propices à la prolifération telles que l'abondance de nutriment ou l'absence de cellules immunitaires (35).

I.1.g. Transmission de *Pneumocystis* spp.

Les champignons du genre *Pneumocystis* spp. sont des microorganismes dépendants de leur hôte qui ont une étroite spécificité avec celui-ci. Pour *P. jirovecii*, l'Homme est ainsi le seul réservoir. La diffusion de la forme kystique se fait par voie aérienne, par transmission directe ou indirecte à partir d'un individu infecté ou porteur (28). Il a été démontré que le champignon était présent dans l'air environnant d'un individu infecté, jusqu'à 5m de celui-ci (36–38). Par ailleurs, les sujets immunocompétents colonisés par le champignon, sans symptôme de la maladie, sont capables de transmettre le champignon à des sujets immunodéprimés à risque de PCP, comme cela a été démontré dans des études murines (39).

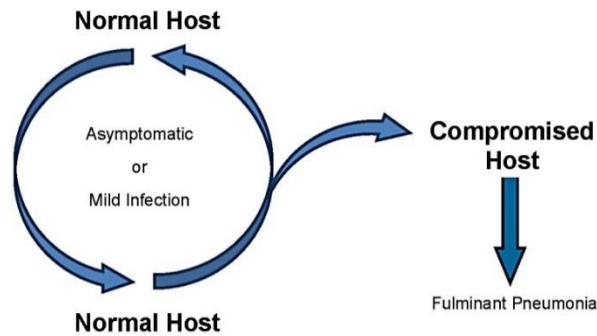


Figure 4: Participation des hôtes immunocompétents à la transmission de *Pneumocystis* sp. (D'après Gigliotti et Wright, 2012) (40)

Pneumocystis spp. pourrait également se transmettre par voie verticale transplacentaire, de la mère à son fœtus. Des expériences ont démontré ce mode de transmission chez des lapins infectés par *P. oryctolagi* (41,42). Chez l'Homme, de l'ADN du champignon a été retrouvé dans les poumons et le tissu placentaire de fœtus issus de fausses couches de mères infectées par le VIH (43).

I.2. Pneumocystose – présentations clinique et radiologique

I.2.a. Présentation clinique

La PCP pulmonaire est une pathologie opportuniste qui se caractérise par une pneumopathie interstitielle diffuse, le plus souvent bilatérale.

La symptomatologie est peu spécifique. Le signe clinique principal de la PCP est une dyspnée qui est progressive et peut évoluer vers une détresse respiratoire aigüe potentiellement mortelle. Cette dyspnée est classiquement accompagnée d'une toux sèche et d'une fièvre modérée. L'examen clinique révèle généralement une tachypnée et une tachycardie sans aucun signe pulmonaire auscultatoire (44). La durée d'incubation de la maladie est inconnue et pourrait varier selon les types de population à risque.

I.2.b. Différences cliniques selon les types d'immunodépression

Le tableau clinique décrit ci-dessus est à nuancer en fonction du type d'immunodépression présent chez le patient concerné. En effet, le développement des symptômes et l'évolution clinique diffèrent selon que le sujet est infecté par le VIH ou qu'il présente une autre cause d'immunodépression.

Chez le sujet séropositif pour le VIH, la PCP est une maladie classant SIDA. Le développement de la pneumopathie interstitielle est insidieux, évoluant sur quelques semaines voire quelques mois. Par opposition, chez les patients non infectés par le VIH (tels que les patients d'onco-hématologie) ou les

patients transplantés d'organe solide, les symptômes apparaissent plus brutalement et la dégradation de la fonction respiratoire est plus fréquente et plus rapide (45,46).

Une étude française menée entre 2007 et 2010 a comparé les sujets VIH et non VIH atteints de PCP. Concernant les principaux signes cliniques, si les deux groupes ont très fréquemment de la fièvre >38°C (74 à 80%) et une dyspnée (73 à 79%), les sujets infectés par le VIH ont plus souvent une toux sèche (78%) que les patients ayant d'autres causes d'immunodépression (54%). En revanche, la dyspnée évolue plus rapidement chez les sujets non VIH avec une saturation en oxygène médiane à l'admission plus basse (91% contre 95% chez les sujets VIH) (46).

L'évolution de la maladie est également différente entre les sujets atteints du SIDA et les autres patients. D'après la même étude française, les admissions en réanimation, les besoins en ventilation mécanique invasive ou non invasive sont significativement plus élevés dans le groupe de patients non infectés par le VIH.

I.2.c. Présentation radiologique

En imagerie, le meilleur examen pour diagnostiquer une PCP est le scanner thoracique. On y observe le plus souvent une atteinte interstitielle diffuse bilatérale avec la présence de plage diffuse de verre dépoli. Toutefois, ce signe radiologique n'est pas spécifique de la PCP et peut évoquer, entre autres, une pathologie bactérienne atypique, une affection virale ou une alvéolite extrinsèque allergique.

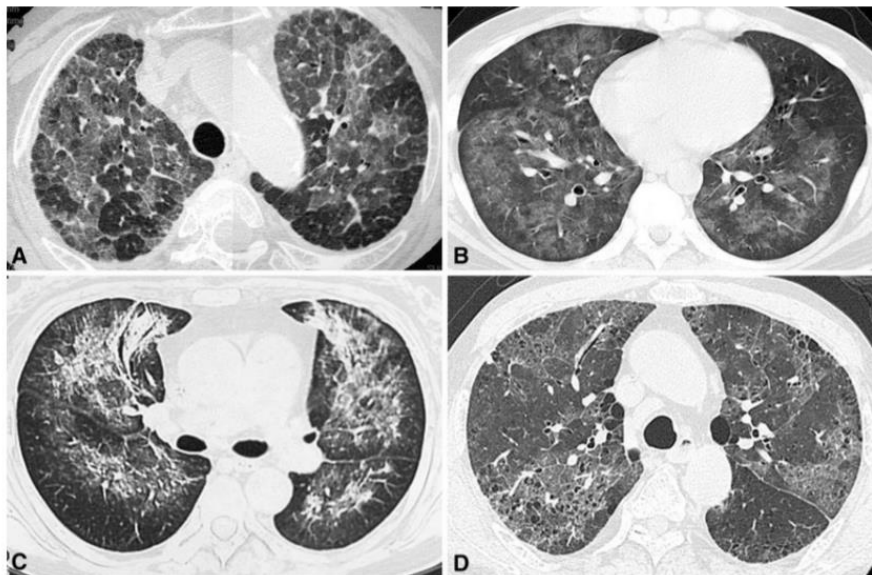


Figure 5: Exemples d'images caractéristiques observées au scanner lors d'une PCP, selon le type d'immunodépression. (D'après Tasaka et Tokuda, 2012)(47)

A: PCP chez un patient atteint d'une arthrite rhumatoïde; B: PCP chez un patient infecté par le VIH; C: PCP chez un patient atteint d'un lymphoma; D : PCP chez un patient atteint d'un cancer.

I.3. Epidémiologie de *Pneumocystis jirovecii* et de la pneumocystose

I.3.a. Fréquence de contacts avec *Pneumocystis jirovecii*

P. jirovecii est un champignon cosmopolite, présent sur tous les continents à l'exception des continents polaires, non étudiés jusqu'à présent. Des études de séroprévalence chez les adultes et chez les enfants de plusieurs pays ont démontré une grande fréquence de contacts des hommes avec le champignon (48). Les premiers contacts avec le champignon se font chez l'enfant en bas âge (49–51). En Angleterre comme en Gambie, 70% des enfants de plus de 8 ans ont des anticorps anti-*Pneumocystis* (52).

Par ailleurs, après ce premier contact, le champignon peut être retrouvé au niveau pulmonaire en tant qu'agent colonisateur, chez les sujets immunocompétents ou immunodéprimés. Des recherches du champignon sur prélèvements respiratoires plus ou moins profonds, effectués chez des enfants ou adultes immunocompétents, ont permis de détecter entre 10 et 20% de sujets porteurs du champignon au niveau pulmonaire (53–56). D'après des études sur du tissu pulmonaire, réalisées dans le cadre d'autopsie chez des Hommes décédés de mort violente ou non en l'absence de pneumopathie, de l'ADN de *P. jirovecii* a été retrouvé dans 20 à 60% des cas (57,58).

La détection pulmonaire du champignon peut être transitoire ou prolongée. Ainsi, le suivi de 9 porteurs de *P. jirovecii* asymptomatiques a montré une absence de détection du champignon chez 7 sujets (78%) 6 mois après la détection initiale, en cohérence avec la capacité de sujets immunocompétents à éliminer le champignon (55,59). L'impact de la colonisation, en dehors de la formation d'un réservoir, n'a pas encore été élucidé, tout en constatant un possible lien avec sur des maladies inflammatoires pulmonaires telles que la bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) (4).

I.3.b. Latence ou infection *de novo* ?

La PCP a longtemps été considérée à tort, comme une réactivation d'une souche latente acquise dans l'enfance. Aujourd'hui, la théorie de l'infection *de novo* est largement admise (60). En effet, la capacité démontrée des individus immunocompétents à éliminer le champignon ainsi que les cas d'épidémies avec des génotypes identiques sont deux arguments forts en faveur d'une infection *de novo*. Par ailleurs, des études longitudinales de typage chez des Hommes colonisés ont montré une évolution de la détection et du typage des souches de *Pneumocystis* dans le temps (61).

L'ensemble de ces données témoigne de la fréquence de contact avec *P. jirovecii* tout au long de la vie d'un Homme, avec des cycles de réinfections et d'éliminations du champignon.

I.3.c. Epidémiologie de la pneumocystose

Concernant la pneumonie à *P. jirovecii*, sa prévalence mondiale est estimée à 500 000 cas par an, dont 400 000 chez des sujets infectés par le VIH (<https://www.gaffi.org/why/fungal-disease-frequency/>). Selon les données du centre de référence national des infections fongiques invasives (CNRMA), la PCP constitue la seconde infection fongique invasive la plus fréquente en France, derrière les candidémies et devant les aspergilloses invasives avec un nombre important de cas en Afrique chez les sujets infectés par le VIH (62). Toujours en France, une estimation datant de 2014 rapporte plus de 600 cas de PCP par an, soit 1/100 000 habitants. Elle représente la deuxième ou troisième infection fongique invasive la plus fréquente selon les études (2,3). La mortalité globale rattachée à la PCP pulmonaire est estimée autour de 20 à 30%, malgré un traitement antimicrobien adapté (rapport CNRMA).

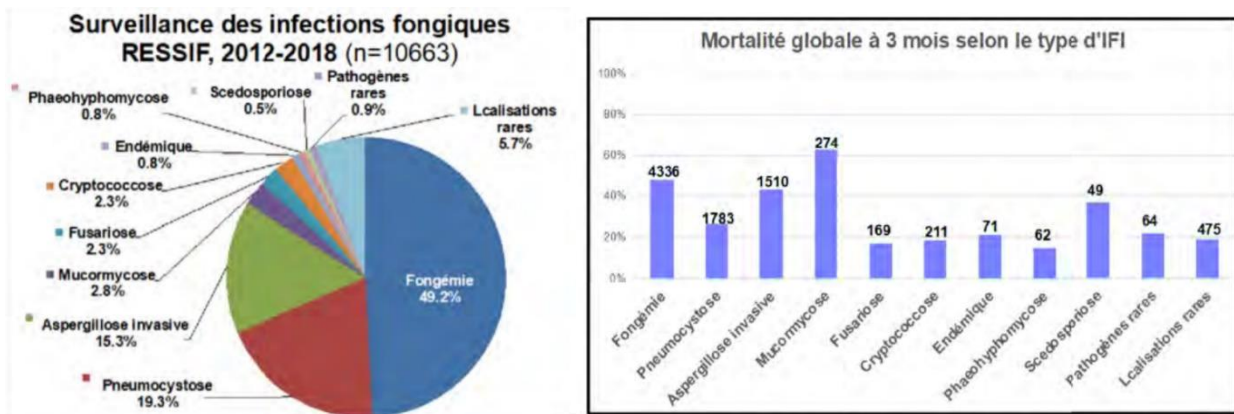


Figure 6: Prévalence et mortalité de la PCP en fonction des autres infections fongiques invasives [D'après les données du centre national de référence des infections fongiques invasives, 2019 (3)]

I.3.d. Facteurs de risques de PCP

La PCP est une maladie opportuniste. Les sources d'immunodépression, principalement celles touchant la lignée lymphoïde, sont des facteurs de risque de cette pneumopathie.

La PCP reste aujourd'hui la maladie opportuniste la plus fréquente chez les sujets infectés par le VIH. Elle est à l'origine de nombreuses primo-découvertes d'infection par ce virus. Néanmoins, le développement des trithérapies puis du traitement prophylactique anti-*Pneumocystis* (lorsque les TCD4 sont en dessous du seuil de risque de 200 cellules/ μ L) ont permis de fortement diminuer la prévalence de la PCP chez les sujets atteints du SIDA dans les pays développés (63). Les cas de PCP chez ces patients sont limités aux patients ignorant leur séropositivité, en rupture thérapeutique ou dont le virus VIH montre des résistances aux antirétroviraux (64).

La prévalence de la PCP dans les pays développés n'a pas diminué pour autant car le nombre de cas a augmenté chez les sujets VIH-négatifs, en parallèle de la croissance des greffes, transplantations et chimiothérapies aplasiantes. En France, moins de 20% des cas de PCP sont aujourd'hui diagnostiqués chez des sujets infectés par le VIH. Les cas de PCP sont retrouvés, en majorité, chez des sujets d'oncohématologie (environ 60%), principalement dans les cas de leucémies ou de lymphomes, ou chez des patients transplantés d'organes solides (environ 20%) (3). Les patients avec cancers solides, pathologies auto-immunes ou encore déficits immunitaires héréditaires sont également concernés par le risque de PCP.

Dans le cas de sujets non infectés par le VIH, en plus d'une possible immunodépression liée à la pathologie sous-jacente, les sujets reçoivent des traitements immunosuppresseurs tels que les traitements anti-rejets, les chimiothérapies et les traitements glucocorticoïdes. Des thérapies immunomodulatrices ciblées dont le rituximab (anticorps monoclonal anti-CD20) ou les inhibiteurs de TNF α (infliximab, etanercept) ont été identifiés comme des facteurs de risque modérés de PCP, le risque étant d'autant plus grand que ces biothérapies sont associées à d'autres thérapies immunosuppressives (65,65,66).

L'utilisation fréquente des corticostéroïdes, dans plusieurs pathologies inflammatoires ou oncologiques fait de la corticothérapie un des facteurs de risques majeurs de la PCP chez les sujets non VIH. Ils sont retrouvés chez 76 à 90% de patients non infectés par le VIH qui développent une PCP (67,68). Le risque est relié à la dose cumulative de corticoïdes reçue (dose et durée de traitement) (67). Une étude révèle qu'une corticothérapie, même intermittente, comme cela peut être le cas dans le cadre de chimiothérapies, augmente significativement le risque de PCP (68).

Différents traitements anti-inflammatoires, immunosuppresseurs ou anticancéreux favorisant le développement d'une PCP, sont rassemblés de façon non exhaustive dans la figure 7 ci-dessous.

Table 1 Immunosuppressive agents associated with the development of *Pneumocystis pneumonia*

Corticosteroids	Purine analogs
Alkylating agents	Azathioprine
Cyclophosphamide	Cladribine
Temozolomide	Fludarabine
Antibiotics/immunosuppressants	Mycophenolate mofetil
Bleomycin	TNF- α inhibitors
Antimetabolites	Adalimumab
Cytarabine	Etanercept
Fluorouracil	Infliximab
Methotrexate	Monoclonal antibodies
Calcineurin inhibitors	Alemtuzumab
Cyclosporine	Rituximab
Tacrolimus	Tocilizumab
mTOR inhibitors	CTLA4-Ig ^a
Everolimus	Belatacept
Sirolimus	

^a CTLA4-Ig: fusion protein composed of the extracellular domain of cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (CTLA-4)

Figure 7 : Traitements immunosuppresseurs ou immunomodulateurs associés à un risque accru de PCP (D'après Tasaka et Tokuda, 2012) (47)

Par ailleurs, parmi les patients présentant des pathologies à risques ou recevant des traitements immunosuppresseurs, certains paramètres biologiques ont été identifiés comme des marqueurs de risque de PCP.

Chez les patients infectés par le VIH, un taux de LT CD4 sanguin inférieur à 200 cellules/ μ L a été clairement identifié comme un facteur de risque de PCP. Plus ce nombre T CD4 est bas, plus la probabilité d'avoir une PCP est élevée. En effet, 90% des patients VIH-positifs atteints de PCP présentaient moins de 200 TCD4/ μ L de sang. Ce facteur de risque ne permet pas de prédire de la même façon le risque de PCP chez les patients non infectés par le VIH (69). Néanmoins, plusieurs études ont révélé un risque de PCP associé au nombre de lymphocyte total. La réactivation du cytomégalovirus (CMV) constitue également un autre facteur de risque de PCP, notamment chez les transplantés d'organe solide (70,71).

De plus, l'absence de prophylaxie est un facteur de risque important compte tenu de sa très bonne efficacité (surtout cotrimoxazole).

I.3.e. Facteurs de risques de mortalité

La mortalité globale de la PCP est estimée autour de 20 à 30%, malgré une thérapie antimicrobienne adaptée. Cependant, la mortalité est variable en fonction des pathologies sous-jacentes et des causes d'immunodépression.

Les PCP chez des patients atteints du SIDA ont une évolution plus lente et induisent une mortalité plus faible, de l'ordre de 10% (72). Chez les sujets HIV-négatifs, la mortalité est globalement plus élevée mais elle n'est pas homogène entre les différents groupes de patients à risques. Elle est plus élevée chez les patients d'oncologie (50%) ou atteints de pathologies auto-immunes (30%-40%) que chez les receveurs d'organes solides, notamment les transplantés rénaux (autour de 20%) (72).

Selon plusieurs études cliniques, un âge avancé, une corticothérapie préalable à la maladie, les co-infections (notamment à CMV) et des maladies pulmonaires sous-jacentes, sont aussi des facteurs de mauvais pronostics de la maladie (73–75).

I.4. Le diagnostic biologique de la PCP

P. jirovecii reste actuellement non cultivable sur les milieux mycologiques classiques (dont le milieu Sabouraud) ou en culture cellulaire. Le diagnostic biologique de PCP doit, par conséquent, faire l'objet d'une demande ciblée par les médecins cliniciens car il ne peut être réalisé à l'aide d'un examen mycologique standard.

Son diagnostic repose aujourd'hui sur trois techniques qui peuvent être complémentaires : une recherche directe par microscopie, une détection d'ADN par biologie moléculaire dans un prélèvement respiratoire et un marqueur sérologique non spécifique, les BDG.

I.4.a. Les prélèvements respiratoires

Concernant la recherche spécifique de *P. jirovecii*, par microscopie ou par PCR, la nature du prélèvement respiratoire est fondamentale. *P. jirovecii* se loge préférentiellement au plus profond de l'arbre pulmonaire, au niveau alvéolaire. Ainsi, plus le prélèvement respiratoire sera profond, meilleure sera la sensibilité du test diagnostique. Le liquide de lavage broncho-alvéolaire (LBA) constitue le « gold standard », tandis qu'une expectoration ou encore un lavage de bouche (restant très superficiels au niveau pulmonaire) sont des prélèvements de moins bonne qualité (76). L'expectoration (induite ou non) pourra être utilisée en première intention chez les sujets infectés par le VIH qui ont habituellement des charges fongiques plus élevées que les autres patients, ou chez les enfants (76,77).

I.4.b. L'examen microscopique

Le diagnostic biologique de PCP à *P. jirovecii* a longtemps reposé sur l'examen microscopique de prélèvements respiratoires après coloration. Les champignons du genre *Pneumocystis* ne sont pas observables à l'état frais ou avec les techniques de coloration classiques habituellement réalisées lors

des examens directs d'analyses mycologiques (noir chlorazole, bleu de lactophénol). Il est nécessaire de réaliser une des colorations suivantes :

- une coloration argentique type Gomori-Grocott ou Musto
- le bleu de toluidine
- le May Grümwald Giemsa (MGG)
- la coloration de papanicolaou
- la coloration fluorescente non spécifique du calco-Fluor-White (fluorophore se liant aux polysaccharides de configuration Beta)

Il est également possible de réaliser une technique d'immunofluorescence avec l'utilisation d'anticorps spécifiques anti-*Pneumocystis* marqués par un fluorophore. Le MGG et certaines colorations d'immunofluorescence permettent d'observer à la fois les kystes et les trophozoïtes de *P. jirovecii*, tandis que les autres colorations ne permettent d'observer que les kystes.

La recherche microscopique du champignon présente une bonne spécificité mais une sensibilité limitée (78,79). Néanmoins, elle reste aujourd'hui la technique de référence. Sa positivité signe généralement une PCP maladie (et non une colonisation) car la charge fongique est suffisamment importante pour positiver l'examen.

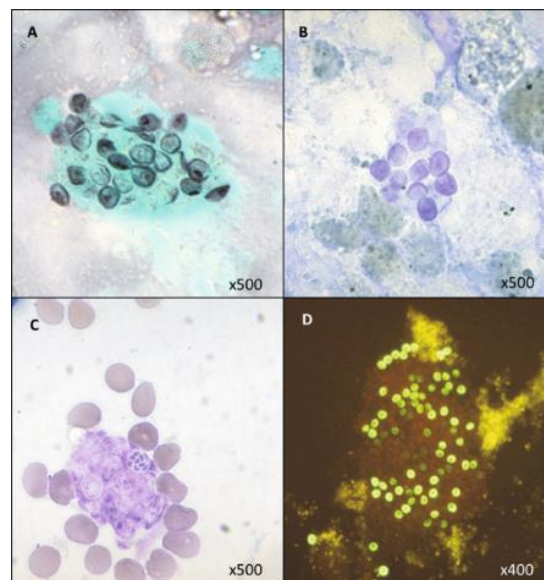


Figure 8: Observation microscopique de kystes et trophozoïtes de *P. jirovecii*
(D'après les photos de l'Association Française des Parasitologie et Mycologie (ANOFEL))

A : Kystes de *P.jirovecii* colorés au Musto. B : kystes de *P. jirovecii* colorés au bleu de toluidine. C : kystes et trophozoïtes colorés au MGG. D : kystes colorés par immunofluorescence.

I.4.c. La recherche moléculaire

Les PCR *Pneumocystis* se sont développées dans les années 1990 avec l'objectif d'améliorer la sensibilité du diagnostic (80). Les gènes cibles de ces PCR à visée diagnostique sont généralement le gène *msg* qui code pour la protéine de surface MSG ou le gène mitochondrial *mtLSU* codant pour la grande sous unité de l'ARN ribosomal (76). Ces deux gènes sont largement répétés dans le génome du champignon et permettent ainsi une détection sensible du pathogène.

Les PCR *P. jirovecii* à visée diagnostiques se caractérisent par leurs très bonnes sensibilités et leurs excellentes valeurs prédictives négatives sur LBA. Cependant, leur spécificité pour le diagnostic de la pneumonie à *P. jirovecii* est altérée par la détection de colonisations à *P. jirovecii* (81). Pour améliorer l'interprétation et la spécificité de ce diagnostic, les PCR *Pneumocystis* sont le plus souvent quantitatives (qPCR). La charge fongique est estimée par le cycle seuil (Ct) ou par la quantité d'ADN cible, permettant ainsi de distinguer les patients atteints de PCP, des patients colonisés (82–84). Toutefois, si les faibles Ct (associés aux fortes charges fongiques) sont bien corrélés aux PCP, il est plus compliqué d'interpréter les PCR aux faibles charges fongiques (85). Il est à noter que les seuils d'interprétation des PCR sont dépendants de la technique utilisée (gène cible et conditions de PCR) et du type de prélèvement respiratoire. Un seuil spécifique peut aussi être établi pour les patients infectés par le VIH (chez qui les charges fongiques sont plus élevées que chez les autres patients) sans corrélation avec une clinique plus sévère.

Le centre national de référence des infections fongiques invasives (CNRMA) a observé sur l'ensemble des cas de PCP qui lui sont rapportés, que l'examen direct était positif dans 45,3% et la PCR dans 85,0% des cas, avec des variations significatives selon le terrain (meilleure sensibilité de l'examen direct chez les patients infectés par le VIH). Le diagnostic était établi par la seule PCR dans 64% des cas (examen direct négatif) (3).

I.4.d. Dosage de marqueurs sérologiques

La présence de *P. jirovecii* peut être recherchée par le dosage sérologique d'un antigène circulant : le BDG. Il s'agit d'un composant polysaccharidique de la paroi de nombreux champignons dont *Pneumocystis*. En raison de la nature de l'antigène, ce test est non spécifique et se positive lors de nombreuses infections fongiques invasives, telles que les candidoses ou les aspergilloses invasives. Le niveau sérique de BDG est théoriquement élevé voire très élevé au cours des PCP et reste bas dans le cas de colonisations pulmonaires (86–88).

Dans la stratégie diagnostique de la PCP, le dosage des BDG est généralement utilisé dans les situations douteuses, notamment en cas de faible charge fongique détectée par PCR associée à une clinique non

spécifique. Il peut aussi être utilisé pour exclure une PCP en cas de difficulté de prélèvements respiratoires profonds car ce test a une très bonne valeur prédictive négative (86,89).

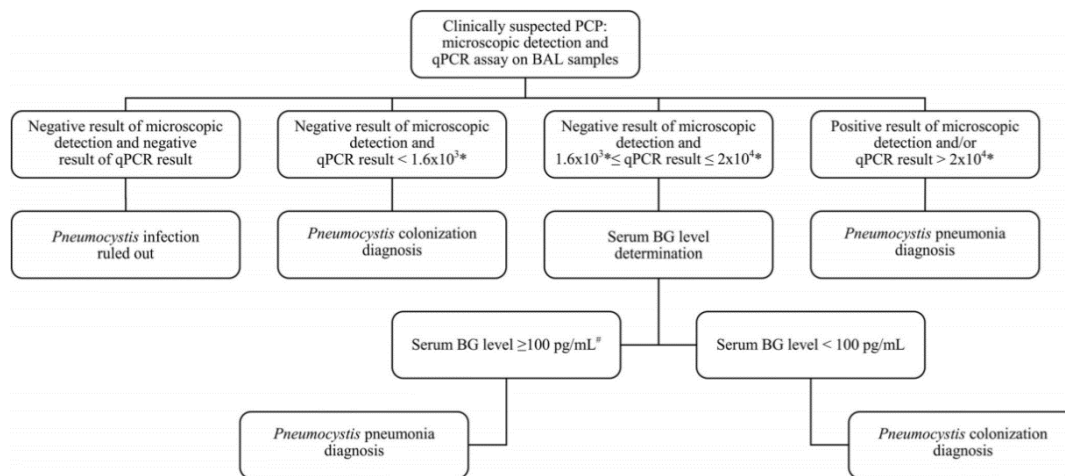


Figure 9: Arbre décisionnel proposé par Damiani C et al. pour le diagnostic de la PCP en fonction des BDG et de la qPCR (2013) (86)

D'autres marqueurs sérologiques ont été évalués dans le cadre de la PCP. Le dosage de la protéine de surface MSG pourrait être une alternative aux BDG mais il n'est pas utilisé en routine dans les laboratoires diagnostiques à ce jour. La lactate déshydrogénase (LDH) et l'antigène Krebs von den Lungen-6 (KL-6), qui constituent des marqueurs de souffrance cellulaire, sont généralement élevés dans le sérum de sujets atteints de PCP (71,89–91). L'association de plusieurs marqueurs sérologiques pourrait être une solution pour aider le clinicien dans le diagnostic des infections à *P. jirovecii* (90).

Par ailleurs, la recherche d'anticorps anti – *P. jirovecii* n'a actuellement pas d'utilité dans le diagnostic de PCP pulmonaire évolutive. Elle permet de détecter un contact antérieur avec le pathogène et constitue ainsi davantage un outil épidémiologique.

I.5. Traitement et prophylaxie de la PCP

I.5.a. Traitement étiologique de la pneumocystose

Le traitement étiologique de la PCP pulmonaire repose sur des traitements antibactériens ou anti-parasitaires. Le traitement de première intention est le cotrimoxazole (sulfaméthoxazole + triméthoprime ou Bactrim®) en comprimés ou par voie injectable. Si la PCP est considérée comme sévère, la durée du traitement est de 3 semaines (92,93). Le cotrimoxazole est le traitement le plus efficace avec une amélioration clinique d'environ 7 jours (93). Il n'existe pas, à l'heure actuelle, de

résistance prouvée de *Pneumocystis* à ce traitement. Néanmoins, le cotrimoxazole est néphrotoxique, hépatotoxique, hématotoxique et sa composante « sulfamide » entraîne fréquemment des allergies (6).

Les alternatives thérapeutiques sont l'atovaquone, le pentacarinate (i.v) ou l'association de clindamycine et primaquine. Cette dernière alternative est à privilégier en cas de forme sévère de PCP.

Parmi les antifongiques, seules les échinocandines (caspofungine, mycafungine) qui ciblent les BDG ont une action potentielle sur *Pneumocystis* (29). Toutefois, leur action est limitée au stade kystique et elles n'ont pas, à ce jour, démontré leur efficacité dans l'élimination du champignon au cours de la PCP humaine (29,92). Les antifongiques azolés ou l'amphotéricine B n'ont pas d'activité sur *Pneumocystis* car ils ciblent l'ergostérol qui est très peu présent dans la membrane de *Pneumocystis*.

I.5.b. Adjonction de corticoïdes

Une immuno-modulation peut également être mise en place dans les cas de PCP sévère, par ajout de corticostéroïdes. Le bénéfice de la corticothérapie est admis pour les PCP sévères des patients infectés par le VIH mais ce bénéfice n'a pas été démontrée pour les patients VIH négatifs (6,7). Le critère de sévérité pour l'ajout de corticothérapie est une PaO₂ inférieure à 70 mmHg ou un gradient alvéolo-artériel d'O₂ supérieur à 35 (93).

I.5.c. Prophylaxie anti-*Pneumocystis*

La prophylaxie repose sur les mêmes molécules que pour le traitement curatif, avec en premier lieu le cotrimoxazole (Bactrim forte 1 fois par 72h) puis l'atovaquone ou le pentacarinate sous forme d'aérosol.

Les indications concernant la prophylaxie sont clairement définies pour les patients atteints du SIDA. Celle-ci doit être mise en place en cas de lymphocytes T CD4 sanguins inférieurs à 200 cellules/ μ L ou une proportion de T CD4 inférieure à 14% des lymphocytes totaux (94). Une prophylaxie secondaire est également mise en place après la PCP pour une durée minimale de 3 mois. Elle pourra être levée lorsque les T CD4 sanguins seront supérieurs à 200 cellules/ μ L et sera réintroduite en cas de nouvelle diminution du nombre de T CD4 en dessous du seuil de 100 cellules/ μ L ou de 200 cellules/ μ L en cas de détection de l'ARN viral (94).

En revanche, pour les patients HIV-négatifs les informations sur la prophylaxie sont moins nettement définies et dépendent de la pathologie sous-jacente. La prophylaxie anti-*Pneumocystis* est recommandée chez les patients transplantés rénaux dans les 6 à 12 mois post-transplantation pour éviter la principale période à risque qui se situe dans les 3 à 6 mois post-transplantation (95). Des recommandations ont récemment été émises pour les patients atteints d'hémopathies ou de cancers solides en cas de thérapie immunosuppressives et avec des nuances selon la pathologie (fortement

recommandée en cas de leucémie aiguë lymphoïde mais optionnelle pour les thérapies des lymphomes) (96). Une prophylaxie chez des patients traités par corticothérapie à forte dose ou de façon prolongée reste un sujet controversé et n'est, pour le moment, pas clairement recommandée (97,98).

1.6. Le rôle de l'inflammation au cours de la pneumocystose

La réaction inflammatoire de l'hôte infecté par *Pneumocystis* est nécessaire pour éliminer le champignon et suffisante chez un sujet immunocompétent. Cependant, une réaction inadaptée et incontrôlée, notamment en cas d'immunodépression, peut se montrer inefficace et être à l'inverse néfaste pour le tissu pulmonaire.

La PCP est une maladie très inflammatoire avec un afflux leucocytaire important dans le tissu pulmonaire. Les études histologiques ont montré que les infiltrats leucocytaires composés principalement de lymphocytes et de polynucléaires sont plutôt situés en péribronchique et en périvasculaire (44). Le tissu interstitiel est également épaissi au cours de la PCP et les alvéoles contiennent un exsudat muqueux hétérogène (99). Ces éléments sont en faveur d'une réaction immune toxique qui cause une diminution des échanges gazeux et induit des troubles respiratoires.

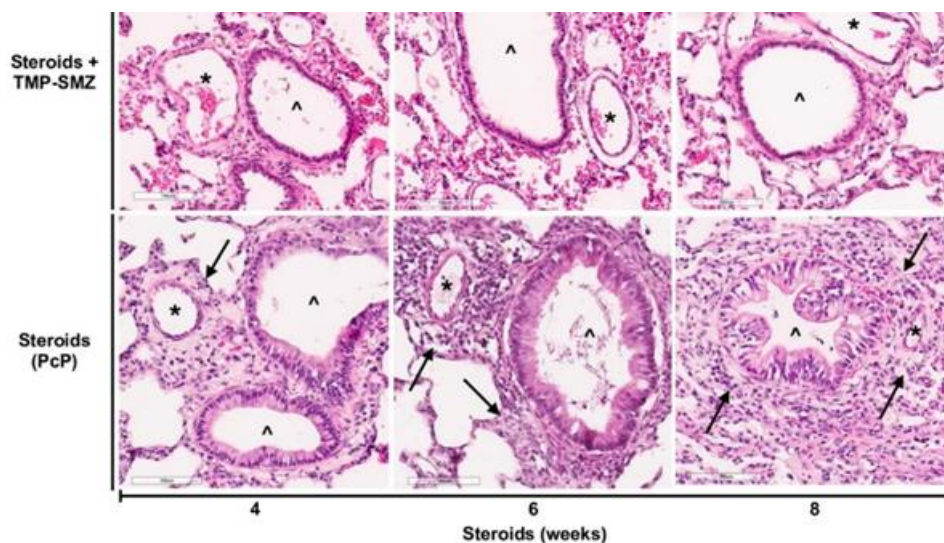


Figure 10: Inflammation péribronchique et périvasculaire observées au cours de la PCP chez le rat (d'après Pérez et al. 2019) (100)

En haut : poumons de rats traités et guéris de la PCP; En bas : poumons de rats infectés non traités, atteints de PCP.

De nombreux arguments sont en faveur d'un rôle pathogène prépondérant de la réponse inflammatoire de l'hôte par rapport à une action cytotoxique directe de *Pneumocystis*. Tout d'abord, il n'y a pas de corrélation entre la sévérité de la maladie et la charge fongique. Les individus infectés

par le VIH ont des charges fongiques plus élevées avec une symptomatologie généralement moins sévère et une évolution moins brutale (46,101). De plus, une reconstitution immunitaire chez un sujet infecté par *P. jirovecii* peut entraîner un syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire (IRIS), correspondant à une réaction inflammatoire importante et brutale associée à une dégradation rapide de la fonction respiratoire (102,103). Par ailleurs, *Pneumocystis* n'a pas de facteur de virulence connu qui contribuerait à un rôle pathogène du champignon et n'a pas ou peu d'activité cytopathique décrite.

La réaction inflammatoire au cours de la PCP sera plus amplement détaillée dans la troisième partie des rappels bibliographiques, après la description des éléments de la réponse immunitaire et de sa résolution qui nous intéresseront pour la suite.

1.7 Modèle murin de la pneumocystose

A ce jour, *Pneumocystis spp* n'est pas cultivable efficacement, limitant de manière importante les études *in vitro* sur ce pathogène. Ainsi, les connaissances actuelles sur le champignon restent limitées quant au cycle ou au développement de la maladie et reposent essentiellement sur les études cliniques ou sur des modèles animaux, principalement la souris et le rat.

L'infection à *Pneumocystis murina* chez la souris a été très étudiée et se rapproche de l'infection à *Pneumocystis jirovecii* chez l'humain. En effet, les souris immunocompétentes (hors nouveau-nés) peuvent être porteuses du champignon et le transmettre par voie aérienne à d'autres souris mais elles éliminent le champignon naturellement après quelques semaines et ne développent pas la maladie (104). En revanche, les souris immunodéprimées, comme les Hommes, n'éliminent pas le champignon et développent une pathologie respiratoire. Comme chez l'Homme, il existe plusieurs stratégies d'immunodépression permettant le développement d'une pneumopathie à *Pneumocystis murina* chez la souris. Ces stratégies reposent sur l'utilisation de souris SCID ou nude, de souris recevant un traitement continu d'anticorps monoclonal anti-CD4 ou encore de corticoïdes (105,106).

Elles présentent, quelques semaines après l'infection (selon le modèle et l'inoculum initial de *Pneumocystis*), une perte de poids pouvant aller jusqu'à la cachexie, des poils hérissés, une diminution de la mobilité, puis la maladie évolue progressivement vers des difficultés respiratoires, une cyanose et peut aboutir au décès de la souris.

Comme chez l'Homme, les études chez la souris démontrent que la pneumocystose est avant tout une pathologie inflammatoire. En effet, la sévérité des lésions pulmonaires n'est pas liée à une charge fongique importante mais à la formation et au développement de lésions inflammatoires péri-alvéolaires (107). Les études murines montrent également un rôle essentiel des lymphocytes dans la pathologie (44) et les rongeurs peuvent présenter, comme les Hommes, une aggravation clinique

respiratoire sévère en cas de restauration brutale du système immunitaire (syndrome de reconstitution immunitaire) (108,109)..

II. Régulation et résolution de l'inflammation

II.1. La résolution de l'inflammation : nouveau paradigme de l'inflammation

II.1.a. Définitions de l'inflammation

L'inflammation est un mécanisme naturel, réactionnel de l'organisme face à une agression telle qu'une infection, une blessure ou la présence de produits toxiques. Elle a pour objectif d'éliminer ces stimuli initiaux. C'est donc un mécanisme de défense, vital pour la bonne santé de l'organisme qui fait partie intégrante de la réaction immunitaire. Il s'agit d'un processus complexe qui fait appel à de nombreux acteurs cellulaires (sanguins ou résidents des tissus), lipidiques et protéiques.

La réaction inflammatoire commence par l'activation des cellules résidentes du site d'agression telles que les macrophages ou les cellules dendritiques du fait d'un stimulus perçu comme dangereux pour l'hôte. Ces stimuli sont détectés par des récepteurs de la famille des « pattern recognition receptors » (PPR) dont les Toll-like receptors (TLRs) situés à la surface des cellules résidentes du tissu. Ceux-ci reconnaissent les PAMPs (pathogens-associated molecular patterns) des microorganismes ou les DAMPs (damage-associated molecules patterns) produits par les cellules lésées lors de stimuli non infectieux (110). Les cellules résidentes activées sécrètent des facteurs solubles dont les cytokines, les chimiokines, les prostaglandines et leucotriènes qui vont déclencher les mécanismes de la phase vasculaire puis cellulaire de l'inflammation. Les cellules endothéliales et épithéliales peuvent également être activées à la suite d'une blessure ou d'un contact avec un pathogène et sécréter elles-mêmes des cytokines et chimiokines.

La phase vasculaire est caractérisée par une vasodilatation des vaisseaux sanguins (après une vasoconstriction courte et transitoire) et par une augmentation de l'expression de facteurs d'adhésion sur les cellules endothéliales vasculaires et sur les leucocytes sanguins. Grâce à ces phénomènes, les leucocytes (tels que les polynucléaires neutrophiles, les monocytes et les lymphocytes) vont affluer sur le site de l'inflammation.

La phase cellulaire comprend les mécanismes leucocytaires ayant pour objectif l'élimination du ou des stimulus(i) initial(aux) au travers de différentes actions : la phagocytose, la production de radicaux superoxydes, de myéloperoxydases et des neutrophils extracellular traps (NETs) découverts récemment (111,112).

L'inflammation peut être localisée au site de l'infection, ou être systémique et concerner alors l'ensemble de l'organisme. L'inflammation peut être aiguë lorsqu'elle dure quelques heures à quelques jours. Au-delà, on parle d'une infection subaiguë pour une durée de quelques semaines et d'inflammation chronique pour un processus inflammatoire prolongé sur des mois voire des années.

L'inflammation induit les quatre symptômes cliniques, autrement appelés « les quatre signes cardinaux de l'inflammation » : rubor (rougeur), tumor (œdème), dolor (douleur) et calor (chaleur).

II.2.b. Effets délétères de l'inflammation

Bien que l'inflammation ait pour but de protéger l'organisme, elle peut avoir des effets délétères sur les tissus. Un grand nombre de pathologies humaines ont un lien avec un processus inflammatoire chronique, non contrôlé. On peut citer classiquement l'ensemble des pathologies inflammatoires auto-immunes (telles que le diabète de type 1 ou la polyarthrite rhumatoïde) et les troubles allergiques et asthmatiques. Mais plus largement, l'état inflammatoire chronique est aussi impliqué dans le développement des cancers, de pathologies neurologiques dégénératives et dans la physiopathologie de plusieurs pathologies infectieuses, comme la tuberculose, les leishmanioses ou le neuropaludisme (110,113–115).

A l'échelle locale du tissu, l'inflammation est un processus qui se fait généralement au détriment du fonctionnement normal du tissu, comme en témoignent les signes cardinaux de l'inflammation. Un exemple de toxicité directe de l'inflammation est la dégranulation des polynucléaires et la libération d'espèces superoxydes (ROS) et de protéases, nocives pour les microorganismes mais également pour les cellules de l'hôte à proximité (116,117). La toxicité est également indirecte avec une modification de l'homéostasie : la sécrétion de mucus augmente la barrière épithéliale et limite également les échanges gazeux alvéolaires ; l'orientation de la machinerie cellulaire vers la production de protéines de l'inflammation diminue la production d'autres protéines telles que l'albumine ; les modifications de perméabilité et d'adhérence du tissu endothélial peuvent porter atteinte à l'hémostase (118). L'objectif de l'inflammation qui est d'éliminer la menace pour l'organisme, devient prépondérant par rapport à la fonction physiologique du tissu endommagé. Ainsi, le système de régulation homéostatique du tissu est dépassé par les mécanismes liés à l'inflammation (118). Par ailleurs, sur le plus long terme, un état d'inflammation chronique peut aboutir à un remaniement du tissu concerné

en lien avec l'infiltration importante de leucocyte, un environnement stimulant la prolifération cellulaire ou encore la production de collagène (119).

Un autre risque est la généralisation de l'inflammation à l'ensemble de l'organisme, autrement appelé le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SRIS). Le sepsis en est un exemple en cas d'infection suspectée ou documentée (120). Cette réponse intense et généralisée à l'échelle de l'organisme peut évoluer vers le choc septique avec une hypotension, une défaillance multiviscérale par hypoperfusion des organes et potentiellement aboutir au décès (121,122).

Selon le stimulus initial, l'objectif de l'inflammation et les risques qui lui sont attribués sont différents (figure 11). Néanmoins, les évolutions défavorables de l'inflammation ont en commun un mauvais contrôle de ce processus ou bien un mauvais contrôle du stimulus initial (123).

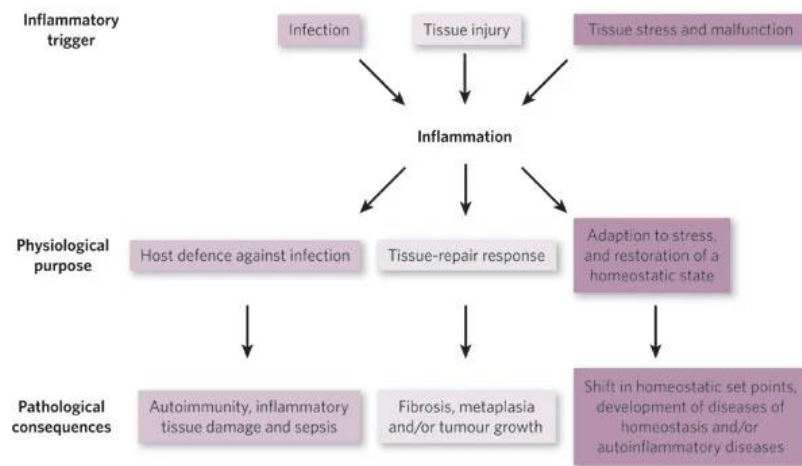


Figure 11: Origine et Rôle physiologique de l'inflammation (D'après Medzhitov, 2008) (123)

II.2.c. La résolution de l'inflammation : nouveau paradigme de l'inflammation

L'arrêt du processus inflammatoire a longtemps été considéré comme un phénomène passif, qui dépendait entièrement et uniquement du contrôle du ou des stimuli initiaux. Ainsi, en cas d'infection, l'élimination du microorganisme (par l'action système immunitaire inné et acquis ou par l'action d'anti-infectieux) signifiait le contrôle et la fin de l'inflammation.

Cependant, depuis quelques années, ce modèle passif a été remis en cause pour être aujourd'hui décrit comme un processus dynamique. Le modèle actuel repose sur le contrôle du stimulus initial et sur l'action d'acteurs moléculaires mettant fin à l'inflammation de l'hôte.

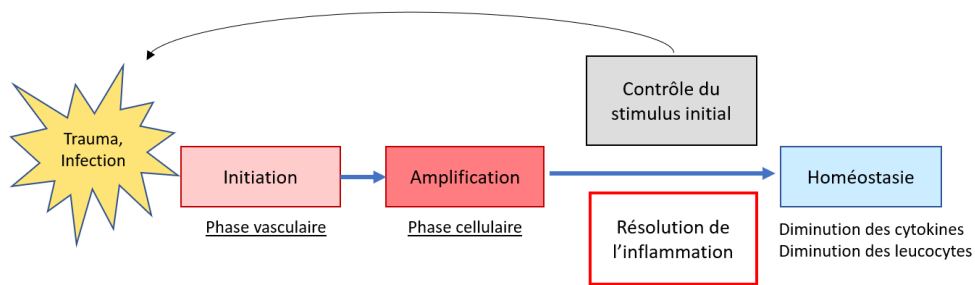


Figure 12: Modèle actuel de la résolution de l'inflammation.

Par ailleurs, ce processus de résolution de l'inflammation démarre quelques jours après le début de l'inflammation et prend progressivement le dessus sur les médiateurs pro-inflammatoires avec la disparition du stimulus initial, afin de permettre le retour à l'homéostasie. Au niveau tissulaire et cellulaire, la résolution de l'inflammation a été définie (en termes généraux) par la clairance des PNN jusqu'au point où ils sont absents du lieu initial d'inflammation (124).

Le dernier modèle cinétique de l'inflammation est constitué de trois phases : l'initiation de l'inflammation, la résolution de l'inflammation et la phase « post-résolutive ». La première phase se déroule lorsque le stimulus est présent et inclut les phases vasculaires et cellulaires de l'inflammation précédemment décrites. La seconde étape, la résolution de l'inflammation, arrive après l'élimination du stimulus initial. Elle consiste à terminer l'inflammation et à favoriser le « nettoyage » du lieu de l'inflammation des cellules et marqueurs solubles pro-inflammatoires, grâce aux mécanismes d'apoptose et d'efferocytose (phagocytose des cellules apoptotiques). Cette phase initie également la réparation tissulaire post-inflammatoire. Enfin, la phase post-résolutive est caractérisée par la présence de cellules de l'immunité adaptative qui permet la protection du tissu concerné et un retour complet à l'homéostasie (125).

En cas d'inflammation excessive, non contrôlée ou de défaut dans la résolution de l'inflammation, le retour à l'homéostasie est impossible et l'état inflammatoire évolue alors vers un état chronique délétère pour les tissus environnants (125).

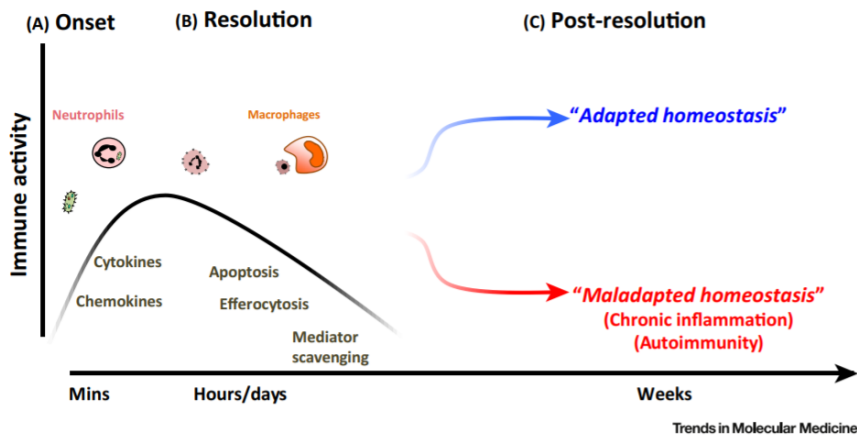


Figure 13: Trois phases successives de l'inflammation : Initiation, Résolution et Post-résolution (D'après Feehan et al., 2019) (125)

II.2.d. Molécules anti-inflammatoires et pro-résolutifs de l'inflammation

Les processus anti-inflammatoires et pro-résolutifs de l'inflammation sont deux mécanismes différents, tous deux nécessaires pour encadrer le processus inflammatoire.

Les éléments anti-inflammatoires visent à réguler l'inflammation pour obtenir un équilibre satisfaisant vis-à-vis des molécules pro-inflammatoires et dans le but de contrôler *in fine* l'intensité de l'inflammation. Il s'agit ainsi d'obtenir une réponse qui ne soit pas trop intense et par conséquent toxique pour les tissus humains mais qui soit toutefois efficace contre l'agent « agresseur ».

La résolution de l'inflammation est quant à elle le processus qui permet de « clôturer » la réponse inflammatoire. Lors de la diminution du stimulus initial, les molécules impliquées dans la résolution de l'inflammation ont pour rôle d'accélérer et d'améliorer les performances des acteurs de l'inflammation afin de permettre le retour à l'homéostasie.

Ainsi, dans la figure ci-dessous sont représentés les effets d'un traitement anti-inflammatoire et pro-résolutif sur l'inflammation. Le premier permet de réduire l'intensité de l'inflammation mais n'a pas d'effet sur la durée de la réaction inflammatoire. En comparaison, le second traitement (pro-résolutif) n'a pas d'effet sur l'intensité initiale de l'inflammation mais a pour conséquence d'accélérer la fin du phénomène inflammatoire (126).

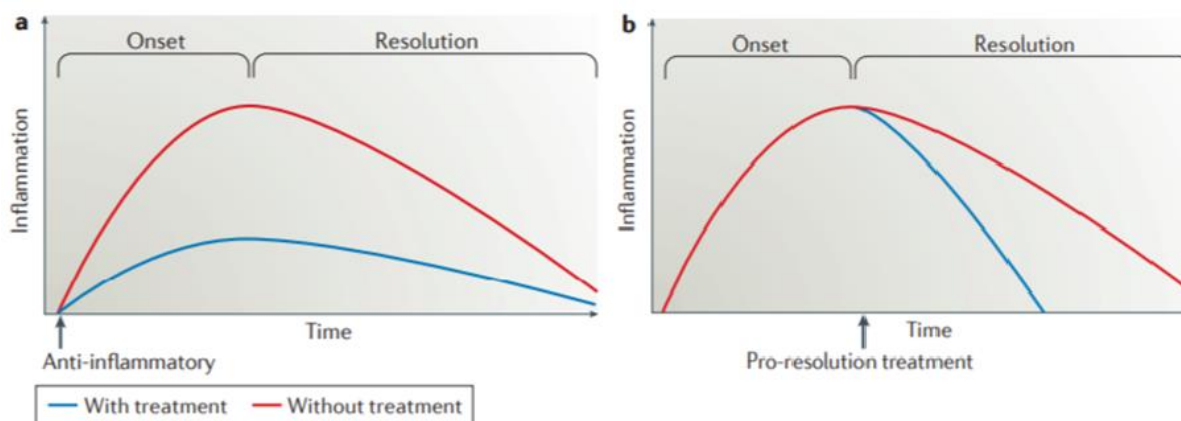


Figure 14: Effet des molécules anti-inflammatoires vs effet des molécules pro-résolutives de l'inflammation (D'après Feehan et al., 2016) (126)

Aujourd'hui, les thérapeutiques luttant contre l'inflammation de l'hôte sont centrées sur l'aspect anti-inflammatoire tels que les anti-inflammatoires stéroïdiens, non stéroïdiens, les anti TNF α . S'ils sont efficaces dans certaines pathologies, ils ont aussi des effets secondaires, notamment une potentielle immunodépression qui entraîne des risques d'infections opportunistes.

II.2. Lymphocytes T CD4 helper, T CD4 régulateurs et contrôle de l'inflammation

Après un contact entre les lymphocytes et les cellules présentatrices d'antigène, la réaction immunitaire adaptative peut débuter. Les lymphocytes T (LT), principalement les lymphocytes T CD4 et leurs différentes sous-populations, jouent un rôle primordial de régulateurs ou de « chef d'orchestre » de la réaction immunitaire et inflammatoire.

II.2.a. Profils Th1, Th2 et Th17 des lymphocytes T CD4 helpers

Les LT CD4 ont été séparés en deux lignées distinctes : les CD4 conventionnels appelés T helpers (Th) et les CD4 régulateurs (127). D'une part, les CD4 T helper (CD4 Th) sont caractérisés par leur capacité à diriger et orienter la réaction immunitaire adaptative et innée vers une réponse cellulaire, humorale, plus ou moins inflammatoire. Les principaux CD4 Th sont les Th1, Th2 et Th17. D'autre part, les T CD4 régulateurs (Treg) ont une fonction immunosuppressive antagoniste aux CD4 T helper. Il existe également d'autres populations T CD4 helper récemment décrites : Th9, Th22 et Thf (T helper folliculaire) (128).

Après activation d'un CD4 naïf par la présentation de son antigène spécifique, des CD4 effecteurs se différencient vers l'un des types de CD4 Th ou en Treg sous l'influence de cytokines produites par des

lymphocytes T CD4 ou par des cellules de l'immunité innée telles que les macrophages, les cellules dendritiques ou les cellules NK (128–130).

Les CD4 Th0 se différencient en CD4 Th1 en présence d'IL12 ou d'IFN γ grâce à l'activation des facteurs de transcription STAT1, STAT4 et Tbet. Les CD4 Th1 produisent en grande quantité les cytokines pro-inflammatoires IFN- γ et TNF- α . La différenciation Th1 est généralement adaptée à l'élimination des pathogènes intracellulaires (dont les virus) car elle amplifie la réponse cellulaire impliquant notamment les TCD8 cytotoxiques et les macrophages, capables d'éliminer les cellules infectées de l'hôte.

Les CD4 Th0 activés en présence d'IL4 se différencient en CD4 Th2 sous l'action des facteurs de transcription STAT 6 et GATA3. Les CD4 Th2 favorisent une réponse humorale avec l'activation des lymphocytes B qui évoluent vers le plasmocyte producteur d'anticorps. La réponse Th2 est utile dans la lutte contre les pathogènes extracellulaires dont les bactéries, champignons et parasites. La fixation des anticorps (Ac) sur les microorganismes extracellulaires limite l'adhérence du microorganisme aux cellules de l'hôte et peut faciliter la phagocytose par les macrophages (opsonisation) grâce à leur fragment Fc ou par activation du complément. Les Th2 produisent majoritairement de l'IL-4 de l'IL-5 et de l'IL-13 qui stimulent à leur tour une réponse Th2. Ils produisent également la cytokine IL-10 qui possède une activité anti-inflammatoire, notamment par son effet anti-Th1.

En présence de TGF- β et d'IL6, les CD4 naïfs se différencient en Th17 avec l'activation des facteurs de transcription STAT3 et ROR γ t. Les CD4 Th17 produisent des cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-17 et l'IL-22. Les CD4 T17 promeuvent une réponse immune cellulaire et une forte inflammation. La réponse Th17 a été impliquée dans la lutte contre plusieurs champignons mais aussi dans des mécanismes pathologiques auto-immuns (131,132).

Les T CD4 peuvent également se différencier en CD4 Th9 qui produisent de forte quantité d'IL-9. Ils sont stimulés par les cytokines IL-4, IL-21, TGF β et inhibés par l'IFN γ . Les Th22 sont stimulés par les facteurs de transcription ROR γ et inhibés par le Tbet. Ils produisent les cytokines IL-22, IL-23 et IL-33. Le rôle de ces deux sous-populations de CD4 T helper est encore peu connu du fait de leur récente découverte mais le Th9 aurait une activité pro-inflammatoire importante tandis que le Th22 aurait une activité régulatrice de l'inflammation (133).

Enfin, les T CD4 peuvent se différencier en Tfh. Celle-ci nécessite une activation multiple, en plusieurs étapes. Ils nécessitent une première activation par les facteurs IL-6, IL-2, et iCOS. La deuxième étape nécessite un contact avec des lymphocytes B activés, spécifiques d'un antigène. Enfin, ils se différencient définitivement au sein de centres germinatifs qui sont des tissus lymphoïdes secondaires

riches en lymphocytes B. L'action des Tfh est nécessaire pour la formation de ces centres germinatifs (134).

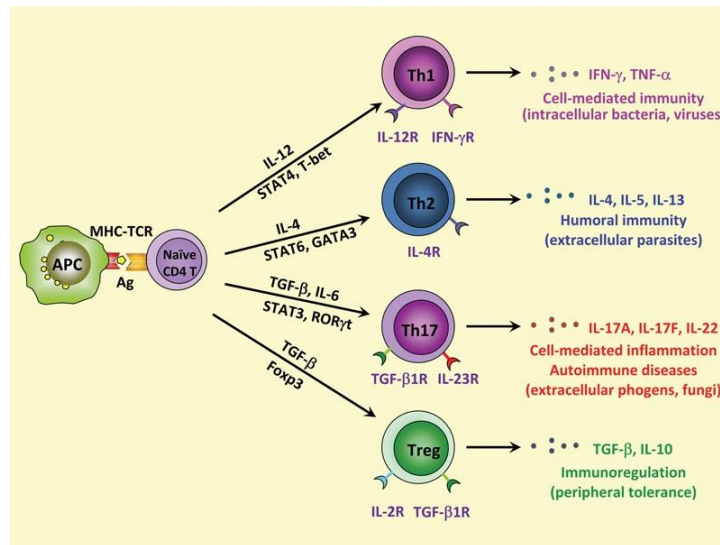


Figure 15: Caractéristiques et différenciation des lymphocytes T CD4 helper et T CD4 régulateurs (D'après Leung et al. 2010) (135)

Par équivalence aux CD4 Th, il existe des sous-populations CD8 cytotoxiques Tc1 ou Tc2 selon les cytokines qu'elles produisent. Les CD8 Tc1 produisent de l'IFN γ et du granzyme B en grande quantité avec une importante activité cytotoxique. Quant aux CD8 Tc2, ils produisent davantage les cytokines IL4 et IL5 et ils ont une activité cytotoxique plus faible.

II.2.b. Lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T CD4 régulateurs sont des cellules qui dérivent des T CD4 naïfs et dont l'action s'oppose à celles des T helper (action immunosuppressive). Ils sont caractérisés par l'expression du facteur de transcription FoxP3 et par la production des cytokines anti-inflammatoires TGF β et IL10.

Les T reg naturels (ou nTreg) sont produits naturellement dans le thymus sans avoir rencontré leur antigène et sont donc naïfs. Par contraste, les Treg induits (ou iTreg) sont issus de la différenciation des T CD4 naïfs périphériques ayant rencontré leur antigène spécifique, en présence de TGF β (136).

L'activité immunosuppressive des Tregs envers les lymphocytes effecteurs repose sur plusieurs mécanismes. Les Tregs produisent des cytokines anti-inflammatoires, à savoir l'IL10 et le TGF β , qui inhibent les différents T helper et les T CD8 cytotoxiques. Les Tregs sont également capables d'induire une apoptose cellulaire des lymphocytes effecteurs (B ou T), via la sécrétion de granzymes et de perforines (127). Les Tregs peuvent aussi éliminer les lymphocytes effecteurs indirectement, en

interagissant avec les cellules dendritiques pour entraîner une production de molécules pro-apoptotiques IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) (127).

Au cours d'une infection aiguë, leur rôle est de contrôler l'intensité de la réaction inflammatoire. Pour les inflammations à caractère chronique, l'objectif des Tregs est de limiter les lésions tissulaires. Ils sont également très importants pour limiter les pathologies auto-immunes en favorisant la « tolérance » envers les antigènes du « soi » (137).

II.2.c. Equilibre des lymphocytes T helper et de la balance pro/anti inflammatoire

Les T CD4 agissent comme des chefs d'orchestre de la réaction immune. Schématiquement, les réponses Th1 et Th17 induisent des réponses cellulaires avec une forte production de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ , IL-2 pour Th1 et IL-17, IL-23 pour Th17). A l'inverse les Th2 promeuvent une réponse humorale, moins inflammatoire avec la production d'IL-4, d'IL-13 et d'IL-10. Quant aux T CD4 régulateurs, ils diminuent toutes les réponses immunes (Th1, Th2 et Th17) et sont fortement anti-inflammatoires.

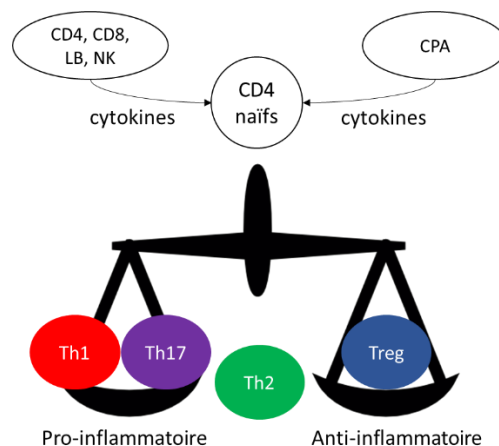


Figure 16: Populations T CD4 helper et T CD4 régulateurs dans l'équilibre pro/anti-inflammatoire

Lors d'une infection, d'une blessure ou d'un autre stimulus, une des réponses Th1, Th2 ou Th17 peut être majoritaire par rapport aux autres. Par exemple, lors d'une infection bactérienne, la réponse Th2 est priorisée, tandis que lors d'une infection virale, la réponse Th1 est majoritaire. Néanmoins, l'un des enjeux de l'organisme est de contrôler le déséquilibre alors créé entre ces différentes réponses, qui

ont le plus souvent des mécanismes complémentaires ou opposés, afin d'éviter l'apparition de lésions tissulaires et fonctionnelles.

Une réponse Th17 déséquilibrée est liée avec le développement de maladies auto-immunes comme le psoriasis ou le lupus érythémateux systémique (LES). Au cours du LES, une étude clinique a montré une augmentation chronique et importante de la réponses Th17 mais aussi une diminution des T CD4 régulateurs, permettant à la réponse Th17 de se développer de façon pathologique (138).

Le diabète de type I a été relié dans diverses études à une stimulation trop importante de la réponse Th1 à l'origine de lésions sur les cellules bêta pancréatiques (139). Ainsi pour tenter de rétablir l'équilibre entre les populations Th, des études menées sur modèle murin ont évalué l'impact d'une co-infection avec des helminthes dont *Shistosoma mansoni* ou *Trichinella spiralis* qui induisent de fortes réponses Th2. Ces expériences ont montré une diminution de l'inflammation et de la destruction des cellules Bêta pancréatiques (140,141). De la même façon, des co-infections associant filaires et *Plasmodium berghei* diminuent le risque de neuropaludisme chez la souris, en lien avec une forte réduction de la réponse Th1 et de la production d'IFN γ (142).

En dehors des mécanismes allergiques, une réponse Th2 prolongée a été décrite comme favorisant la fibrose d'un tissu enflammé (143,144). En effet, les CD4 Th2 stimulent la synthèse de collagène qui, lorsqu'il s'accumule, aboutit à une rigidification des tissus et finalement à une fibrose. A l'opposé, les CD4 Th1 accélèrent la dégradation du collagène via la production d'IFN γ , ce qui permet de diminuer le risque de fibrose. De plus, l'inhibition de la réponse Th2 par les CD4 Th1 (via l'IFN γ) limite l'action profibrotique des CD4 Th2 (84).

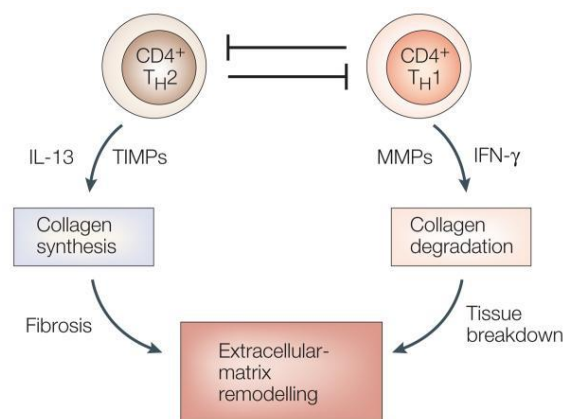


Figure 17: Effets antagonistes des réponses Th1 et Th2 sur les fibres de collagène (D'après Wynn, 2004) (143)

II.2.d. La régulation de la réaction inflammatoire par les lymphocytes T CD4

A l'arrivée des premiers lymphocytes sur le lieu de l'« agression », les premières différenciations cellulaires sont liées principalement aux cytokines produites par les cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Par la suite, il existe en plus de cette stimulation, une régulation des populations Th1, Th2, Th17 et Tregs entre elles (145) :

- Les CD4 Th peuvent entretenir leur propre réponse par la sécrétion de cytokines qui stimuleront d'autres T CD4 et des T CD8 vers une réponse similaire à la leur. Par exemple, les CD4 Th2 produisent de l'IL4 qui va à son tour stimuler d'autres CD4 effecteurs vers une réponse Th2. A l'inverse la production d'IFN γ par les CD4 Th1 va favoriser une réponse Th1.
- Les différents CD4 Th antagonisent la stimulation d'un autre type de Th. En effet, l'IFN- γ sécrété par les CD4 Th1 inhibe la réponse Th2 et Th17 tandis que l'IL4 et l'IL10 secrétées par les CD4 Th2 inhibent une stimulation Th1 ou Th17 (146,147).
- Une autre source importante de régulation vient des lymphocytes CD4 Tregs qui inhibent à la fois les réponses Th1, Th2 et Th17 par la production d'IL-10 principalement, avec une action sur les T CD4 et sur les cellules présentatrices d'antigène.

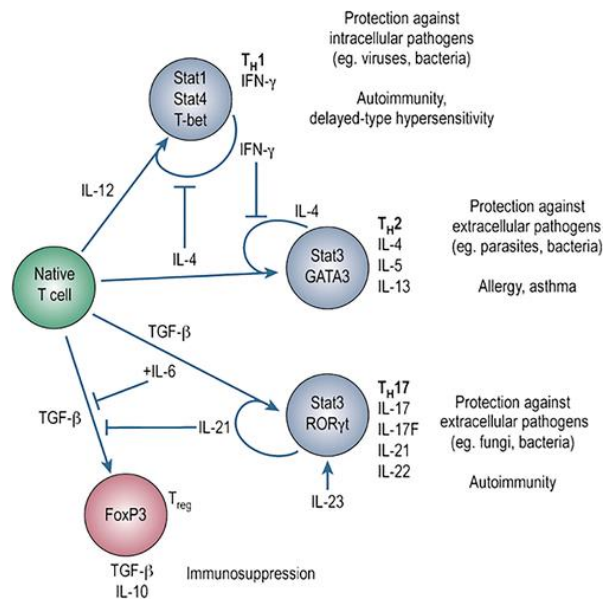


Figure 18: Effets régulateurs entre populations T CD4 helper et T régulateurs (D'après Deenick et Tangye, 2007) (145)

II.3. Lipides de résolution de l'inflammation

II.3.a. Les 4 familles de lipides pro-résolutifs de l'inflammation

Les lipides pro-résolutifs de l'inflammation ou SPM (Specialized Proresolving Mediators) ont été découverts progressivement à partir des années 1980 (148). Il existe aujourd'hui quatre familles distinctes : les lipoxines, les résolvines, les protectines et les marésines. Les quatre familles se distinguent par leur structure chimique, dûe à différents acides gras polyinsaturés (AGPI) précurseurs, mais aussi par leurs fonctions différentes dans la résolution de l'inflammation.

Tous les SPM sont des AGPI issus de la famille des oméga 6 ou de la famille des oméga 3. Ils sont synthétisés au site de l'inflammation et ont une activité locale (fonction autacoïde). Ils peuvent également atteindre la circulation sanguine et impacter d'autres tissus (149). Ils agissent à des concentrations de l'ordre du picomolaire (pmol) ou du nanomolaire (nmol). Ils sont caractérisés par des fonctions communes de résolution de l'inflammation bien que chaque famille et molécule aient des effets propres. Leurs fonctions générales sont de :

- Réduire l'afflux de polynucléaires sur le site d'infection
- Réduire l'expression des cytokines et des eicosanoïdes pro-inflammatoires
- Orienter les macrophages d'une polarisation M1 (pro-inflammatoire) vers une polarisation M2 (pro-résolutive) et promouvoir l'efferocytose (élimination des granulocytes apoptotiques)
- Promouvoir l'apoptose des leucocytes effecteurs.

Ainsi, par ces différentes actions des SPM associées au contrôle du stimulus de stress ou de danger initial, la résolution de l'inflammation se mettra en place et le processus inflammatoire pourra s'éteindre. En revanche, en cas de défaut dans ce processus de résolution de l'inflammation, soit par défaut d'activité des SPM ou soit par persistance du stimulus initial, l'inflammation pourra évoluer vers un stade chronique (124).

Certains SPM ont aussi des capacités anti-nociceptives et participent à la cicatrisation tissulaire post-inflammatoire (131,150).

II.3.b. Métabolisme des lipides de résolution de l'inflammation

Les SPM appartiennent à la famille des AGPI de la classe des oméga 6 (lipoxines) ou des oméga 3 (résolvines, protectines, marésines). Ils sont produits grâce à l'action de plusieurs réactions enzymatiques successives qui sont résumées dans la figure 19.

A l'origine de leur métabolisme, il y a des acides gras polyinsaturés (AGPI): l'acide linoléique (C18 :2 n-6) pour la voie des oméga 6 et l'acide α -linoléique (C18 :3 n-3) pour la voie des oméga 3. Ces AGPI

sont dits « essentiels », c'est-à-dire qu'ils ne peuvent être synthétisés par l'organisme et sont donc obtenus uniquement par le régime alimentaire. La synthèse des SPM dépend donc également du régime alimentaire. Les huiles de tournesol, colza, soja contiennent davantage d'oméga 6. En revanche, on peut trouver les oméga 3 par exemple dans les poissons gras, les noix ou l'huile de lin. Le régime alimentaire peut aussi apporter directement d'autres AGPI : l'acide eicosapentaénoïque (EPA) et l'acide docosahexaénoïque (DHA) de la classe des oméga 3 ou l'acide arachidonique (ARA) et l'acide gamma-linolénique (GLA) de la classe des oméga 6.

Ces AGPI sont des composants des membranes cellulaires, incorporés dans la double couche membranaire, au sein des phospholipides. La première étape pour la synthèse des SPM est donc de libérer les AGPI des phospholipides par l'action de la phospholipase A2 (PLA2). Ensuite l'ARA, le DHA ou l'EPA libres sont métabolisés par les 5-,12-, 15- lipoxigénases (5-LOX, 12-LOX, 15-LOX), cyclooxygénase 1 ou 2 (COX-1 et COX-2) ou par les cytochromes P450 (CYP 450) pour aboutir aux différents métabolites actifs que sont les SPM.

Une des particularités de cette synthèse enzymatique est la nécessaire coordination intercellulaire car les différentes enzymes (citées ci-dessus) sont présentes dans des types cellulaires différents. En effet, la LOX-5 est majoritairement exprimée par les polynucléaires neutrophiles tandis que la LOX-12 est davantage exprimée par les plaquettes et la 15-LOX par les monocytes et cellules épithéliales principalement (151). Par ailleurs, leur activité dépend de leur stéréochimie S ou R.

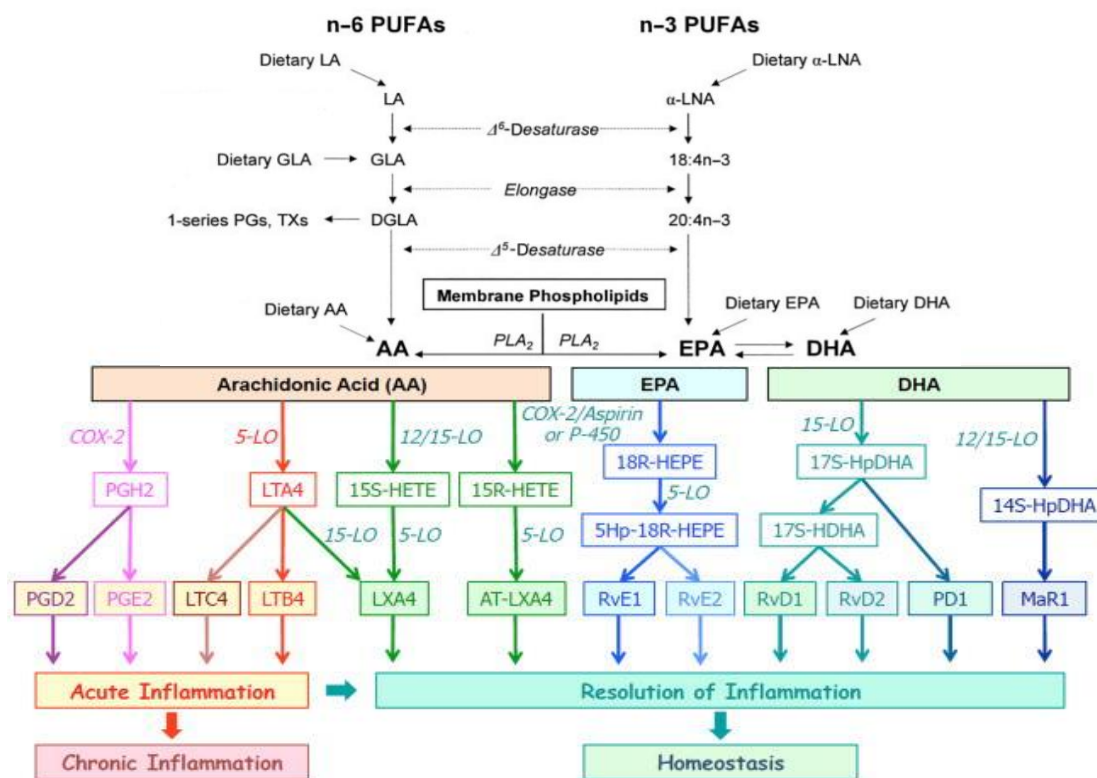


Figure 19: Voies enzymatiques impliquées dans la synthèse des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires et pro-résolutifs de l'inflammation
 [D'après Larsson et al, 2004 (144) et Serhan et Petasis, 2011 (152)]

Comme on peut le voir sur la figure 19 ci-dessus, le métabolisme des SPM est en partie commun avec celui des eicosanoïdes pro-inflammatoires dont les prostaglandines, les thromboxanes et les leucotriènes. L'ARA correspondant à la classe des AGPI oméga 6 peut aboutir à la production de métabolites pro-inflammatoires ou de lipoxines pro-résolutives. Le DHA et l'EPA de la classe des oméga 3 produisent quant à eux une majorité de métabolites pro-résolutifs. De plus, les médiateurs pro-inflammatoires et les SPM partagent aussi des enzymes comme la COX-2 ou les LOX (152).

Pendant le processus inflammatoire, il existe un « switch lipidique » au cours duquel la production de lipides pro-inflammatoires (prostaglandines, leucotriènes) évolue progressivement vers les lipides de résolution de l'inflammation. Ce switch lipidique semble dépendre de l'expression de l'enzyme 15 LOX qui permet la production de LXA4 au lieu du LTA4 et la production de résolvines et de protectines à partir des AGPI de la classe des oméga 3. Ce changement enzymatique est induit, au moins en partie, par les médiateurs pro-inflammatoires PGE2 et PGD2 (153–155).

Les SPM ont une courte durée de vie et sont rapidement catabolisés par des réactions enzymatiques de déshydrogénation ou d'oxygénation en métabolites inactifs. La lipoxine A4 est ainsi dégradée par

la 15-deshydrogénase ou par ω-oxydation tandis que les résolvines D et E sont oxydées en 18- et en 12-oxo résolvines E ou en 17-oxo résolvines D (151).

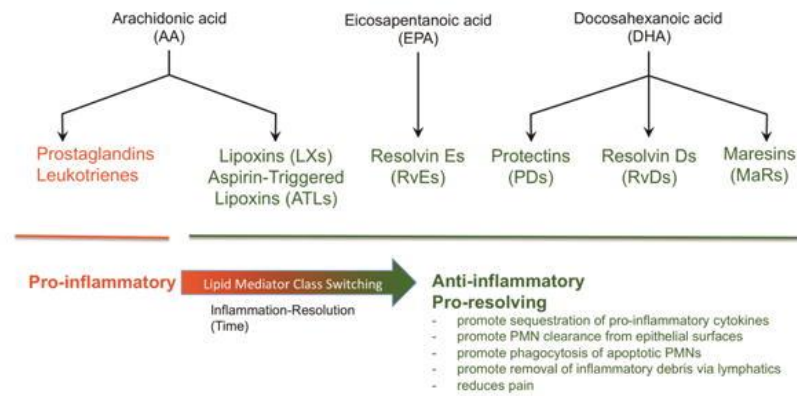


Figure 20: Switch lipidique au cours de l'inflammation
(D'après Serhan et al, 2015) (156)

II.3.c. Mode d'action des lipides de résolution de l'inflammation

Comme les eicosanoïdes pro-inflammatoires, les SPM agissent sur des cellules cibles en se fixant comme agonistes sur des récepteurs à 7 domaines transmembranaires couplés à une protéine G, différents selon le SPM étudié. Les SPM ont des actions spécifiques selon le composé, bien que leurs fonctions se recouvrent la plupart du temps entre SPM. Celles-ci sont résumées dans la figure 21 ci-après.

Tous les récepteurs des SPM n'ont pas encore été identifiés. On connaît par exemple le récepteur ALX/FRP2 pour la lipoxine A4 qui a une forte action sur les PNN en limitant leur migration tissulaire et en inhibant la production de cytokines pro-inflammatoires et d'espèces superoxydes (157,158). Les lipoxines sont aussi de puissants agents stimulateurs des monocytes et augmentent la phagocytose des macrophages (158). La résolvine D1 (RVD1) peut se fixer sur le même récepteur ALX/FRP que la lipoxine A4 mais aussi sur le récepteur GPR32 présent sur les cellules phagocytaires. Elle inhibe également la migration tissulaire et les fonctions pro-inflammatoires des PNN (159). En plus de son activité agoniste sur le récepteur ChemR23 des cellules phagocytaires, la résolvine E1 peut inhiber l'action du LTB4 pro-inflammatoire par compétition sur leur récepteur commun BLT1 présent à la surface des polynucléaires (155). Quant à la marésine 1 (produite par les macrophages à partir du DHA) elle joue un rôle important dans la stimulation de l'efferocytose et de la réparation tissulaire (160).

Il est possible que certains SPM (dont la RVD1) agissent indirectement sur l'inflammation, par la voie des récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome proliferator activated receptor), comme les eicosanoïdes pro-inflammatoires (161–163). Néanmoins, cela reste un sujet controversé (164).

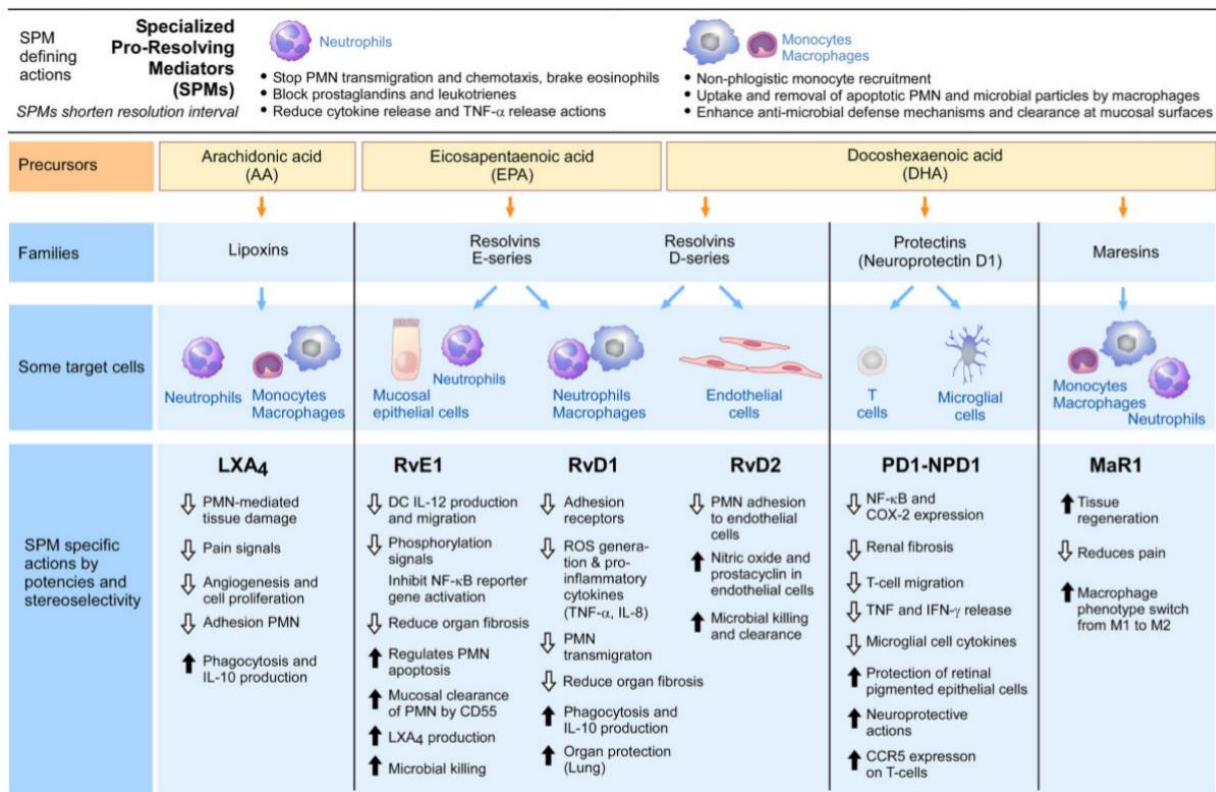


Figure 21: Mode d'action et effet de différents composés lipidiques pro-résolutifs de l'inflammation (D'après Buckley, Gilroy and Serhan, 2014) (124)

II.3.d. Lipides de résolution de l'inflammation et infections

L'intérêt des SPM a été montré dans des contextes pathologiques variés telles que : la cicatrisation post-chirurgicale, les pathologies neurodégénératives (dont la maladie d'Alzheimer) ou les pathologies respiratoires comme l'asthme (162,165,166). Plusieurs études sur des modèles murins ont aussi permis d'évaluer l'impact de modifications des SPM dans l'évolution des infections. La figure 22 rassemble les résultats d'un certain nombre de ces études (167).

Ainsi, l'addition de lipoxines augmente la survie des souris infectées par *Trypanosoma cruzi* ou par des souches de *Plasmodium* causant le neuropaludisme (168,169). A l'inverse, la déplétion en enzymes du métabolisme des lipoxines aggrave l'atteinte pulmonaire des souris infectées par les virus de la grippe ou du virus respiratoire syncytial (170,171). Les résolvines et les protectines ont également montré un effet positif sur les infections à *Escherichia coli* ou *Influenza*, respectivement (172,173). De plus, des tests réalisés chez des souris infectées par *E coli* ont montré qu'en cas d'association à des SPM, il était possible de diminuer la dose d'antibiotique nécessaire pour soigner l'infection (174).

Cependant, les SPM n'ont pas toujours un effet bénéfique sur les infections. En effet, l'ajout de lipoxine au cours d'une infection par *Mycobacterium tuberculosis* augmente paradoxalement la mortalité des souris. A l'inverse, la déplétion en 5-LOX améliore la clairance de la mycobactérie (175). De même,

l'ajout de lipoxine lors d'une infection à *Toxoplasma gondii* réduit la mortalité mais augmente la charge parasitaire (176).

Ces différences d'effets des SPM pourraient être liées à une différence de réponse inflammatoire nécessaire pour le contrôle du microorganisme, comme dans le cas de *M. tuberculosis* pour lequel une réponse Th1 est davantage bénéfique que délétère. Cela pourrait aussi s'expliquer par une question de moment et de durée d'apport des SPM au cours de l'infection. En effet, l'ajout trop précoce des SPM pourrait gêner une bonne initiation de la réponse Th1, utile à la lutte contre certains microorganismes pathogènes comme *T gondii*. Cependant, le fait que la déplétion totale en SPM (souris 5 LOX KO et 15 LOX KO) aboutisse à une augmentation de la mortalité en cas d'infection à *T gondii* suggère un rôle important des SPM à un moment de l'infection pour limiter un dommage lié aux cytokines pro-inflammatoires (177).

Table 1. Summary of the role of pro-resolution lipid mediators in animal models of infectious disease

Infection	Model	Finding	Reference
Lipoxins			
Influenza A	Mouse	Down-regulation of <i>SOCS2</i> (required for lipoxin activity) associated with greater virulence	12
Respiratory syncytial virus	Mouse	5-lipoxygenase deficiency (required for lipoxin production) associated with greater lung pathology	15
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Mouse	Lipoxin contributes to mortality and mycobacterial load	19
<i>Toxoplasma gondii</i>	Mouse	Lipoxin reduces mortality but increases parasite load	21,22
<i>Trypanosoma cruzi</i>	Mouse	15-epi-lipoxin A4 reduces parasitaemia and increases survival	23
<i>Plasmodium berghei</i> -ANKA	Mouse	15-epi-lipoxin A4 increases survival	24
Periodontitis (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)	Rabbit	Lipoxin reduces leucocyte infiltration and bone destruction	25
Resolvins			
Sepsis	Mouse	Resolvin reduces mortality	29
<i>Escherichia coli</i> peritonitis	Mouse	Resolvin reduces mortality and enhanced the antimicrobial effect of ciprofloxacin	30
<i>Staphylococcus aureus</i> skin infection	Mouse	Resolvin enhances the antimicrobial effect of vancomycin	30
Burn-related sepsis	Rat	Resolvin reduces mortality	31
<i>E. coli</i> pneumonia	Mouse	Resolvin reduces histological severity of pneumonia and mortality	32,34
<i>E. coli</i> peritonitis-associated acute lung injury	Mouse	Resolvin reduces mortality	34
Ocular herpes simplex virus	Mouse	Resolvin reduces lesion severity	36
Protectins			
Influenza A	Mouse	Protectin reduces viral replication <i>in vitro</i> and increases survival <i>in vivo</i> .	37

Figure 22: Effets des lipides pro-résolutifs de l'inflammation sur divers modèles infectieux (D'après Russel and Schwarze, 2014)(167)

II.3.e. Influence des substances exogènes sur la résolution de l'inflammation

La résolution de l'inflammation débute physiologiquement après une stimulation liée à un processus inflammatoire. Ce sont les prostaglandines PGE2 et PGD2 qui induisent une augmentation de l'activité de la 15-LOX, entraînant alors la production des différents SPMs.

Cependant, il y a un impact des substances exogènes sur la biosynthèse des SPM, que ce soit les traitements médicamenteux (principalement anti-inflammatoires) ou les régimes alimentaires (source des précurseurs des SPMs).

L'aspirine agit sur la COX-2 de façon irréversible pour inhiber la production de prostaglandines. Toutefois, la COX-2 acétylée reste active sur certaines cibles. Elle transfère alors sa capacité catalytique d'oxygénation vers la production de lipoxines, résolvines et protectines en complément de l'action des LOX ou des CYP 450 des voies classiques de biosynthèse. Les SPM induits par l'aspirine ont une différence de chiralité par rapport aux SPM classiques comme la 15 épi-lipoxine (lipoxine induite par l'aspirine) qui est 15^R au lieu de 15(S) (178,179). Ils peuvent avoir des fonctions légèrement différentes de leur SPM chiraux correspondant et ils sont généralement plus stables dans le temps entraînant potentiellement une activité plus importante (151,180). Ainsi, l'aspirine a la capacité de stimuler la résolution de l'inflammation, indépendamment des signaux habituels de l'organisme (179). Les autres anti-inflammatoires non stéroïdiens qui inhibent la COX-2 de façon réversible n'ont pas cet effet sur la résolution de l'inflammation (10). Par ailleurs, les anti-inflammatoires stéroïdiens (glucocorticoïdes) ont aussi un impact, cette fois négatif, sur le métabolisme des SPMs (181,182). Ceci peut être lié à l'inhibition par les corticoïdes des enzymes PLA2 responsables de la libération des AGPI précurseurs des SPMs, incorporés dans les phospholipides des membranes cellulaires (183,184).

En dehors des traitements anti-inflammatoires, la production des SPMs dépend aussi de l'apport nutritionnel en AGPI. Les oméga 6 sont quantitativement plus présents dans la nutrition de l'Homme. Un régime plus ou moins riche en EPA ou DHA a un impact sur la production des différents lipides impliqués dans l'inflammation, pro-inflammatoires ou pro-résolutifs (185). Des études cliniques chez des sujets sains ont montré qu'une supplémentation nutritionnelle en ARA modifie la composition des phospholipides membranaires et augmente la production de PGE2 et de TXA4 (pro-inflammatoires) mais sans modification observée des cytokines (102). Un enrichissement en oméga 3 (DHA+EPA) du régime alimentaire a montré un effet anti-inflammatoire lié à la réduction de la PGE2 et des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF α (98,99). De plus, une supplémentation en acide gras marin chez des hommes sains induit une augmentation des résolvines, protectines et marésines dans les heures suivant l'administration (189). Le régime enrichi en oméga 3 a aussi montré ses avantages sur des pathologies inflammatoires telle que la polyarthrite rhumatoïde chez des rongeurs, en lien avec une diminution de l'ARA (190,191).

III. La physiopathologie inflammatoire de la pneumocystose pulmonaire

Le système immunitaire des mammifères est capable de contrôler et d'éliminer *Pneumocystis* sans avoir recours à un traitement antimicrobien, dès lors que l'hôte est immunocompétent. Cependant, en cas d'immunodépression, l'hôte infecté n'est plus capable d'éliminer le champignon qui se multiplie alors dans le tissu alvéolaire. Dans ce cas, une réaction inflammatoire excessive et inefficace se développe dans les poumons et celle-ci est à l'origine des lésions pulmonaires et donc des symptômes de la maladie.

Dans ce contexte, nous reviendrons sur les éléments de la réponse immune, utiles ou nécessaires pour éliminer *Pneumocystis*. Pour cela, nous décrirons dans une première partie ce qui est connu de la réponse immune chez les sujets immunocompétents infectés. Dans un second temps, nous traiterons les déficits immunitaires qui augmentent le risque de PCP afin d'identifier les éléments de la réponse immune qui sont absolument nécessaires à la lutte contre le champignon. Enfin, nous étudierons la réponse immune chez les sujets immunodéprimés au cours de la PCP, pour mieux comprendre quels sont les éléments de la réponse inflammatoire réellement délétères pour les poumons, et quels sont ceux, au contraire, bénéfiques pour éliminer *Pneumocystis*.

III.1. Réponse immune physiologique chez un sujet immunocompétent

Chez les sujets immunocompétents, l'infection par *Pneumocystis sp* est contrôlée par l'hôte sans aucun symptôme pulmonaire observable. Dans les modèles murins, une souris immunocompétente infectée peut éliminer le champignon en trois à cinq semaines selon les études (selon l'inoculum, les souches de souris et le mode d'infection) (110,192,193). Les Hommes immunocompétents sont également capables d'éliminer le champignon comme l'ont démontré des études cliniques longitudinales (55,61).

La PCP étant une pathologie opportuniste, le champignon et la pathologie sont principalement étudiés chez les sujets immunodéprimés. Ainsi, les connaissances de la réponse immune physiologique reposent essentiellement sur les modèles murins infectés par *P. murina*. Il est à noter que dans la très grande majorité de ces études réalisées sur des rongeurs, il s'agit de primo-infections, tandis que l'Homme qui développe une immunité notamment sérologique au cours de l'enfance et subit par la suite des réinfections.

III.1.a. Stimulation des cellules résidentes et chémoattraction des leucocytes

Lors de l'infection de rongeurs par *Pneumocystis sp* par la voie respiratoire, les cellules résidentes des poumons sont activées par plusieurs molécules présentes sur la paroi ou membrane du champignon.

La glycoprotéine MSG et les BDG présents sur la paroi des kystes agissent comme des PAMPS et sont reconnus par des TLR (le plus important étant Dectin-1) des cellules dendritiques, des macrophages et des cellules épithéliales alvéolaires (194–196). Cette interaction induit une activation de la cellule et la production de cytokines (dont IL-8, TNF α , IFN- γ), de chémokines (dont MCP-1) et d'eicosanoïdes pro-inflammatoires, notamment *via* la voie NF-k-beta (197–199). L'interaction entre le champignon et les cellules dendritiques aboutit également à l'expression de CCR7 à leur surface. Ceci entraîne alors une migration de ces cellules dendritiques vers les ganglions ayant pour conséquence une stimulation de l'immunité adaptative (194).

Les trophozoïtes ne possèdent pas de paroi fongique et par conséquent pas de BDG. Néanmoins, ils sont capables de stimuler les cellules dendritiques. Les éléments impliqués dans cette interaction restent cependant inconnus.

III.1.b. Afflux des leucocytes dans les poumons

Sous l'action des CPA et des cytokines produites, les leucocytes infiltrent le tissu pulmonaire. Il y a une augmentation importante de la cellularité du tissu pulmonaire et du LBA avec un pic d'une à deux semaines post-infection.

Cette augmentation s'explique majoritairement par un accroissement des cellules lymphocytaires mais aussi par un afflux de macrophages et de polynucléaires sur le site de l'infection. Le retour à la normal s'effectue en parallèle de la baisse de la charge fongique. La cinétique d'infiltration des différentes cellules a été rapportée par Swain *et al.*. Elle est représentée dans la figure 23 ci-dessous (200).

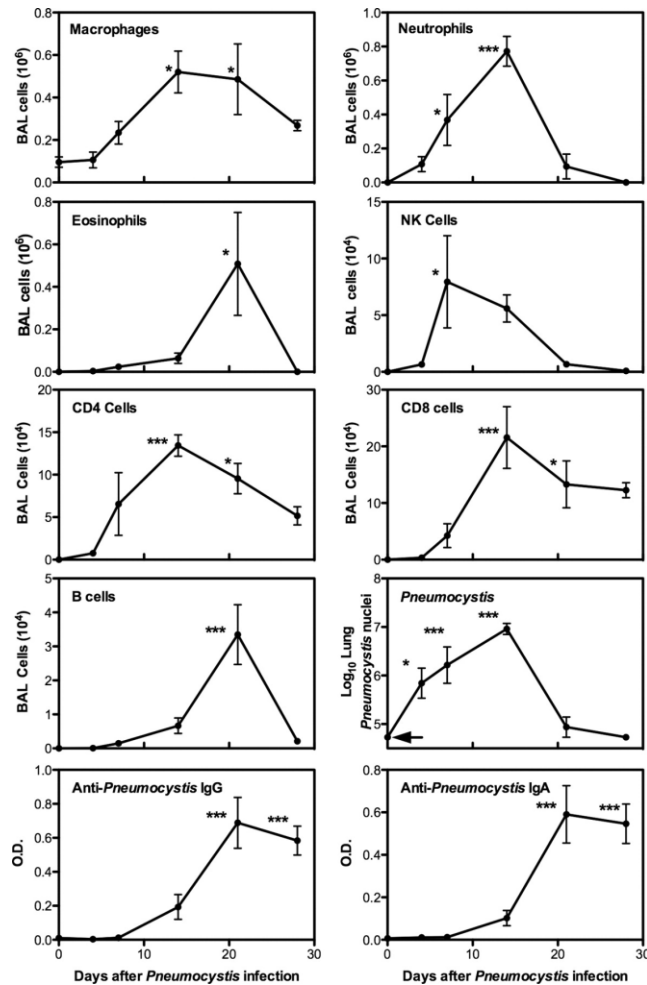


Figure 23: Réponse immunitaire d'une souris immunocompétente à la suite d'une infection par *P. murina* (D'après Swain et al, 2011) (200)

III.1.c. Réponse immunitaire lymphocytaire

La caractérisation des lymphocytes T dans les poumons des souris infectées montre une augmentation rapide des T CD4 et des T CD8, dès la première semaine d'infection puis une diminution autour de la 3^{ème} semaine post-infection (200,201). Les T CD4 augmentent également de façon importante à la fin de la première semaine dans les ganglions. Puis ils diminuent progressivement, témoins de la mise en place de la réponse adaptative après stimulation par les CPA (201). Les lymphocytes B et les anticorps IgG et IgA arrivent plus tardivement dans les poumons, mais leur afflux coïncide avec la décroissance de la charge fongique.

Concernant les profils de réponse de T helper, la réponse Th1 et la réponse Th2 sont toutes les deux stimulées avec une augmentation des cytokines IFN- γ , TNF α et IL-4 (201–203). Néanmoins, certaines études ayant calculé le ratio des deux réponses *via* la production de cytokines, *via* les isotypes d'anticorps après un second challenge ou *via* des observations histologiques rapportent une réponse Th2 prédominante chez les souris immunocompétentes (200,201,204,205). Selon Shellito *et al*, une

semaine après infection de souris immunocompétentes, il y a un ratio de 4:1 pour le rapport Th2:Th1 dans les poumons et 10:1 dans les ganglions. Puis les ratios évoluent vers 2:1 et 5:1, trois semaines post-infection (pic de l'infection) dans les poumons et dans les ganglions, respectivement (201). La réponse Th17 pro-inflammatoire est aussi stimulée par l'infection à *Pneumocystis sp* (193,202). La balance anti-inflammatoire est assurée par les Tregs et la cytokine IL-10 qui augmentent aussi dans les poumons infectés des souris immunocompétentes (193,203).

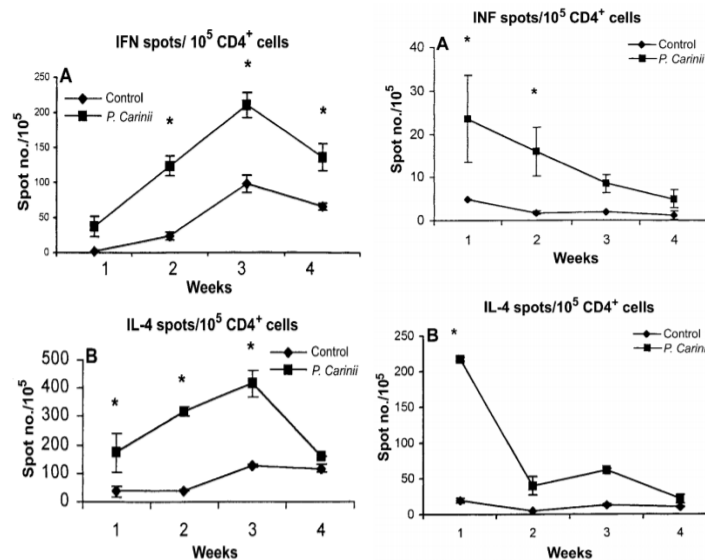


Figure 24: Augmentation des populations T CD4 Th1 et Th2 chez des souris infectées par *Pneumocystis* dans les poumons et les ganglions.
(D'après Shellito et al., 2000) (201)

Les deux figures A et B à gauche représentent les réponses Th1 et Th2 dans les poumons. Les deux figures A et B à droite représentent les réponses Th1 et Th2 dans les ganglions.

Certains travaux ont montré que le stade de *Pneumocystis sp.* (kyste ou trophozoïte) présent évoluant majoritairement dans les poumons pourrait avoir une influence sur le type de réponse, probablement en lien avec une différence d'activation des CPA. Ainsi, une activation des CPA par le stade kystique induirait une réponse pro-inflammatoire Th17 avec affluence de T CD8, tandis qu'une activation par les trophozoïtes provoquerait à l'inverse, une diminution de l'interaction entre les cellules dendritiques et les T CD4 (206).

III.1.d. Elimination de *Pneumocystis sp* par phagocytose et activité cytotoxique

La capacité des macrophages à éliminer le champignon *Pneumocystis sp.* après phagocytose a été démontrée *in vitro*. Le rôle des macrophages est de ce fait considéré comme un élément majeur dans la clairance du champignon (207,208). Les macrophages sont capables de phagocyter *Pneumocystis*

avec ou sans opsonisation. Le mécanisme sans opsonisation implique les récepteurs Dectin1 reconnaissant les résidus BDG du champignon (207).

Dans le contexte de l'infection à *P. murina* chez des souris immunocompétentes, les macrophages ont une activation prédominante par la voie alternative, autrement dit une activation par les cytokines de la réponse Th2 (IL4 et IL13 entre autres). Ceci est en cohérence avec le profil des T CD4 Th2 majoritaire décrit ci-dessus au cours des infections à *Pneumocystis* chez l'immunocompétent. Il s'agit ainsi de macrophages de profil M2, régulateurs de l'inflammation et encourageant une réponse Th2 (209,210).

Les T CD8 cytotoxiques (Tc1) prélevés chez des souris infectées n'ont pas montré de capacité cytotoxique directe sur *P. murina*. En revanche, en cas de co-culture avec des macrophages non polarisés, la présence de T CD8 Tc1 augmente l'élimination du champignon (211,212).

Les cellules NK sont dotées d'une capacité fongicide sur *Pneumocystis in vitro*, et cette activité cytotoxique est augmentée par la présence de T CD4 mémoires, qui eux ne peuvent pas éliminer *Pneumocystis* (213).

Les polynucléaires éosinophiles ont également pu éliminer *Pneumocystis* dans une expérience *in vitro*, leur capacité fongicide étant améliorée en présence d'IL-4 et d'IL-13 (106).

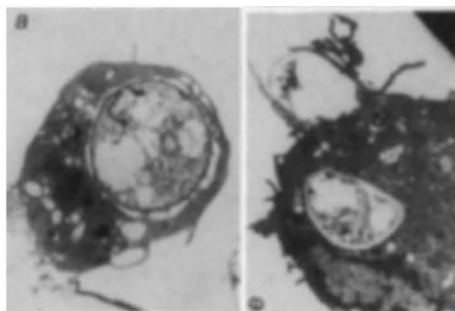


Figure 25: Phagocytose d'un kyste de *P. carinii* par un macrophage de rat, observée par microscopie électronique.
(D'après Ezekovitz, 2011) (214)

III.1.e. Résolution de l'inflammation

Jusqu'à présent la résolution de l'inflammation n'a pas été étudiée dans le cadre d'une infection à *Pneumocystis sp*, que ce soit chez les rongeurs ou chez l'Homme. Il n'existe donc aucune donnée sur les lipides de résolution de l'inflammation à notre connaissance.

III.2. Etude des déficits immunitaires à risque de pneumocystose : Identification des cellules essentielles pour l'élimination du champignon

L'étude des différents facteurs de risque de PCP peut donner des indications sur les cellules essentielles à la défense du système immunitaire contre *Pneumocystis*. En effet, qu'il s'agisse de déplétion artificielle chez la souris ou de déficit immunitaire héréditaire ou acquis (iatrogène ou infectieux) chez l'Homme, le développement ou non de PCP dans ces différentes conditions sont des indices importants pour établir des éléments de réponse physiologiques du système immunitaire en cas d'infection à *Pneumocystis*, à plus forte raison si ce sont des déficits ciblés.

Différents types d'immunodépression ont été établis comme facteurs de risque de PCP chez l'Homme : les hémopathies, les cancers solides, les transplantations d'organe solide, les maladies inflammatoires ou encore des thérapies monoclonales ciblées. Cependant, un déficit de la réponse immune cellulaire et principalement la lignée lymphocytaire est le principal facteur de susceptibilité au champignon (215,216).

III.2.a. Déficiences concernant les lymphocytes T CD4

Les lymphocytes T CD4 sont des cellules essentielles pour la lutte contre *P. jirovecii*, comme le démontre le risque important de développer une PCP chez les patients infectés par le VIH avec un nombre de CD4 sanguins inférieur à 200 cellules/mm³ (8,217). Par ailleurs, plus le nombre de CD4 est faible, plus le pronostic de la maladie est mauvais (218–220). Néanmoins le seuil de 200 cellules/mm³ établi comme facteur de risque chez les patients séropositifs HIV, ne semble pas suffisant pour les patients non infectés par le VIH (69).

Le modèle murin a confirmé la nécessaire action des lymphocytes T CD4 dans la lutte contre la PCP car l'utilisation d'anticorps spécifiques anti-CD4 induit le développement d'une PCP chez les souris infectées (9,221).

Bien que le rôle majeur des T CD4 au cours d'une infection à *Pneumocystis sp.* ait été solidement établi, le profil de réponse T helper utile pour la lutte contre le champignon reste très controversé. D'un côté, la neutralisation de l'IFN γ par des anticorps spécifiques chez des souris infectées immunocompétentes ne montre pas d'effet sur la clairance du champignon ou sur l'état clinique des souris (99,222). D'un autre côté, les souris déplétées en récepteur de l'IL-4 sont également capables d'éliminer le champignon, dans des délais comparables aux souris sauvages avec une polarisation M2 moins forte des macrophages (209). De même, la neutralisation de l'IL-17 n'empêche pas non plus l'élimination de *Pneumocystis sp.* chez les souris infectées, même si la clairance est légèrement retardée (202,223).

Concernant les Tregs, leur apport lors d'une infection à *Pneumocystis* apparaît plus net. Chez l'Homme, les sujets atteints du syndrome IPEX (immune dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X linked syndrom) qui correspond à une déficience dans le facteur de transcription FoxP3, présentent le risque de développer une PCP (224). Les études chez un modèle murin immunocompétent montrent qu'une déplétion en IL-10 ou en Tregs, aboutit à une clairance plus rapide de la charge fongique et révèle également une augmentation de l'inflammation (192,203,225). Seuls Rong *et al.* trouvent une clairance retardée en l'absence d'IL-10 (193).

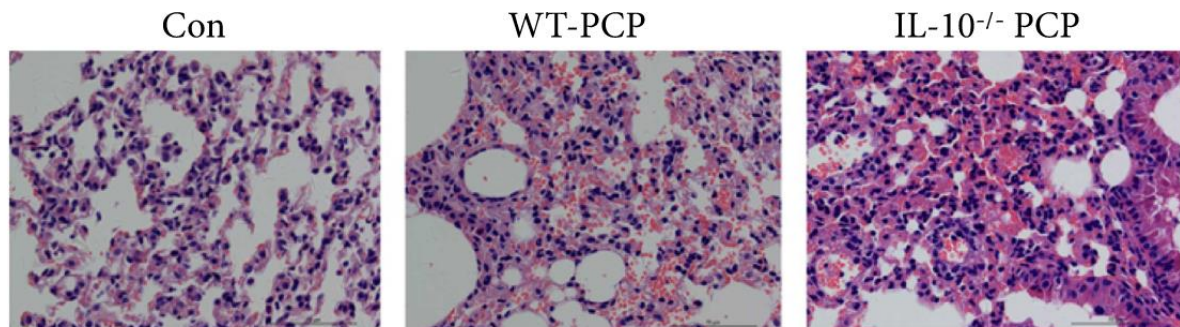


Figure 26: Effets de la déplétion en IL-10 sur l'inflammation pulmonaire chez des souris infectées par *P. murina* (D'après Rong *et al.*, 2019) (193)

Coupes histologiques de poumons de souris naïves (à gauche), de souris immunocompétentes infectées par *P.murina* (au milieu), de souris infectées par *P.murina* et déplétées en IL-10 (à droite).

III.2.b. Déficiences concernant les lymphocytes B

Le rôle des lymphocytes B (LB) dans la PCP a été peu étudié comparativement aux lymphocytes T CD4. Toutefois, de nombreux arguments sont en faveur d'une implication essentielle de ces cellules dans la réponse physiologique contre *Pneumocystis*.

Dans les modèles murins, les souris μ MT^{-/-} ou Jh^{-/-}, déficientes en LB matures, sont incapables d'éliminer le champignon *P. murina* et développent une PCP (226–228). Chez l'Homme, le traitement par un anticorps monoclonal anti CD20 (Rituximab – Rituxan[®] ou Mabthera[®]) ou par un inhibiteur de la Bruton tyrosine kinase (ibrutinib) ciblant spécifiquement les LB, a été identifié comme un facteur de risque de PCP (65,66,229).

Un déficit en LB implique une dérégulation de plusieurs mécanismes immuns (dont la production d'anticorps). Il entraîne aussi l'activation directe des lymphocytes T CD4 par les LB. Que ce soit pour le switch isotypique des anticorps (de la classe des IgM vers les IgG, IgA et IgE) ou pour l'activation des T CD4, un contact entre LB et T CD4 est nécessaire, *via* le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II et le système CD40L/CD40. Chez l'Homme, le déficit immunitaire héréditaire en CD40L (présent sur les lymphocytes T CD4) appartenant aux « syndromes d'hyper IgM lié à l'X » est à risque

élevé de PCP (230,231). Le CMH de classe II et le CD40 sont exprimés sur les LB et sur les APC. Cependant une déplétion ciblée en CMH II ou en CD40 sur les LB induit une PCP chez les souris infectées (226,232). Ces éléments soulignent l'importance de l'interaction entre les LB et les T CD4 pour le contrôle de l'infection à *Pneumocystis sp.*

Concernant la production d'Ac, une déplétion des récepteurs aux fragments constants des Ac (FcγR) présents notamment sur les macrophages augmente significativement la charge fongique de *Pneumocystis* dans le modèle murin, le champignon étant toutefois éliminé (232). La déplétion en système complément ne modifie pas la charge fongique ni la symptomatologie des souris (232). Par ailleurs, la PCP est rare chez les sujets atteints de la maladie de Bruton (autrement appelée agammaglobulinémie liée à l'X) ou atteints du déficit en STAT 3, pathologies qui, toutes les deux, diminuent significativement les niveaux d'Ac (233–236).

L'activation des T CD4 au cours de l'infection à *Pneumocystis* est également diminuée en cas de déplétion en LB ou en CD40 sur les LB spécifiquement (226,232). De plus, un transfert de T CD4 de souris saines infectées par *Pneumocystis* vers des souris déplétées en lymphocytes récemment infectées permet d'éviter la PCP. A l'inverse, un transfert de T CD4 provenant de souris Jh^{-/-} (déplétées en LB) ne permet pas d'éliminer le champignon (237). De façon générale, une absence d'activation des T CD4 par les LB aboutit à une chute de la réponse Th2 (238). Rong *et al* ont montré qu'au cours d'une infection à *Pneumocystis* sans action des LB, les réponses Th1 et Th17 augmentent significativement en parallèle du développement de la PCP chez la souris. Le transfert de LB sains chez ces souris permet de réduire la surexpression de cytokines Th1 tout en diminuant la charge fongique. Ceci serait lié à la production d'IL-10 anti-inflammatoire par les LB qui inhibe les réponses Th1 et Th17 (239).

III.2.c. Déficiences concernant les lymphocytes T CD8

Contrairement aux lymphocytes T CD4 et aux LB, le déficit isolé en lymphocytes T CD8 n'est pas un facteur de risque de PCP. Des souris infectées et déplétées de leurs CD8 par injection d'Ac spécifiques anti-CD8 peuvent éliminer le champignon, sans délai de clairance et sans lésions histologiques pulmonaires observables (221). Ceci suggère que les T CD8 ne jouent pas un rôle essentiel dans la clairance du champignon en présence de toutes les autres cellules du système immunitaire.

III.2.d. Déficiences concernant les polynucléaires neutrophiles

Contrairement aux déficiences immunitaires combinées (DIC) ou déficiences immunitaires combinées sévères (DICS) touchant plus ou moins globalement la lignée lymphocytaire, les sujets atteints de syndromes de déficiences immunitaires concernant les polynucléaires neutrophiles (PNN) ne sont pas (ou peu) un risque de déclaration d'une PCP. La granulomatose septique chronique est un déficit immunitaire

héréditaire lié à l'absence de NADPH (enzyme impliquée dans la production d'espèces superoxyde). Ce déficit représente un risque élevé d'infections fongiques opportunistes telles que l'aspergillose, les candidoses, les phaeohyphomycoses, ou encore les trichosporonoses. Cependant, en dehors de quelques cas décrits dans la littérature, les patients atteints de cette maladie ne développent pas de PCP (240).

A partir d'un modèle animal, Swain *et al* n'ont pas trouvé de susceptibilité augmentée à la PCP en cas de déplétion en polynucléaires dans les poumons (CXCR2 KO), ni en cas d'élimination de la production en espèces superoxydes (GP91^{phox} KO) ou en cas de suppression de la production des espèces réactives de l'oxygène et de l'azote (phox/INOS KO) (241). La charge fongique n'étant pas augmentée par ces déplétions en conditions physiologique ou d'immunodépression, l'activité fongicide des PNN sur *P. murina* semble peu importante.

III.2.e. Déficiences concernant les macrophages

La diminution du nombre de macrophage chez des rats infectés par *P. carinii* entraîne une nette augmentation de la charge fongique. Ceci indique une importance de ces cellules dans la clairance du champignon (208).

Une inhibition de la cytokine TNF α , produite essentiellement par les macrophages de polarisation M1, activés par la voie dite « classique », ne semble pas constituer un facteur de risque majeur avec une incidence faible de PCP chez les patients traités par infliximab ou etanercept (242,243). Chez les souris, la déplétion en récepteur du TNF α n'entraîne pas de PCP.(99).

La voie du Nuclear Factor NF κ B est essentielle à l'activation dite « classique » des macrophages (244,245). Elle est activée par *Pneumocystis sp* via la fixation des BDG du champignon sur le récepteur Dectin-1 présent à la surface des macrophages (197,246). Mais l'inhibition de la voie NF κ B chez le modèle murin n'empêche pas l'élimination du champignon. Elle entraîne une réponse Th2 et une polarisation M2 des macrophages plus marquée que chez les souris sauvages avec un retard de la réponse Th17 (247,248).

De la même façon, le déficit héréditaire en protéine NEMO (Nuclear Factor Kappa Beta Essential Modulator) qui active la voie NF κ B présente peu de risque de PCP. De rares cas de PCP ont été décrits chez les patients atteints de ce déficit immunitaire (249).

Ainsi, les macrophages auraient un rôle essentiel au cours de la PCP, probablement en lien avec leur capacité reconnue à éliminer le champignon par phagocytose. Cependant, la voie NF κ B qui stimule une polarisation davantage M1 des macrophages serait inutile. Cela serait cohérent avec la polarisation M2 observée chez les souris infectées immunocompétentes.

III.2.f. Déficit concernant les lymphocytes NK

Les lymphocytes NK ont été peu considérés pour le moment dans le contexte de la PCP. Cependant, Kelly Mn *et al.* ont observé que des souris déplétées uniquement en lymphocytes NK ($\gamma c^{-/-}$) présentent une charge fongique élevée 4 semaines post-infection, comparable à une déplétion en lymphocytes T CD4 (213).

Par ailleurs, Warschkau *et al.* ont retrouvé une diminution de la production d'IFN γ *in vitro* par les cellules spléniques mises en contact avec *P. murina* en l'absence de lymphocytes NK, ce qui implique un rôle de ces cellules dans l'activation de la réaction immune adaptative contre le champignon (250).

III.2.h. Déficit concernant les polynucléaires éosinophiles

Une hyperéosinophilie sanguine ou dans le LBA a été observée chez des patients atteints de PCP dans plusieurs études cliniques, chez des sujets VIH-positifs, des patients transplantés et des patients avec un déficit immun héréditaire (251–253). Eddens *et al.* ont observé qu'en cas de déplétion isolée en éosinophiles, la charge fongique pulmonaire de *Pneumocystis* augmentait chez les souris infectées (106).

L'ensemble des données résumées dans le tableau I, montrent que les lymphocytes T CD4 sont des cellules essentielles. Cependant, nous ignorons encore à quel type de polarisation (Th1, Th2 ou Th17 ou Treg) est associée une réponse favorable ou défavorable de l'infection. Les LB sont également nécessaires, en tant que cellules activatrices des T CD4. Elles jouent aussi un rôle effecteur dans la production d'anticorps. Les T CD8 semblent, quant à eux, ne pas avoir de rôle nécessaire dans des conditions physiologiques chez l'immunocompétent. Concernant l'immunité innée, les macrophages semblent importants, en tant que CPA et/ou en tant que cellule effectrice par phagocytose. Bien que les cellules NK soient peu étudiées dans le contexte de la PCP, elles semblent nécessaires pour le contrôle de l'infection. Selon ces données, les PNN ne seraient pas indispensables à l'action contre *Pneumocystis*, du moins pour leur fonction cytotoxique.

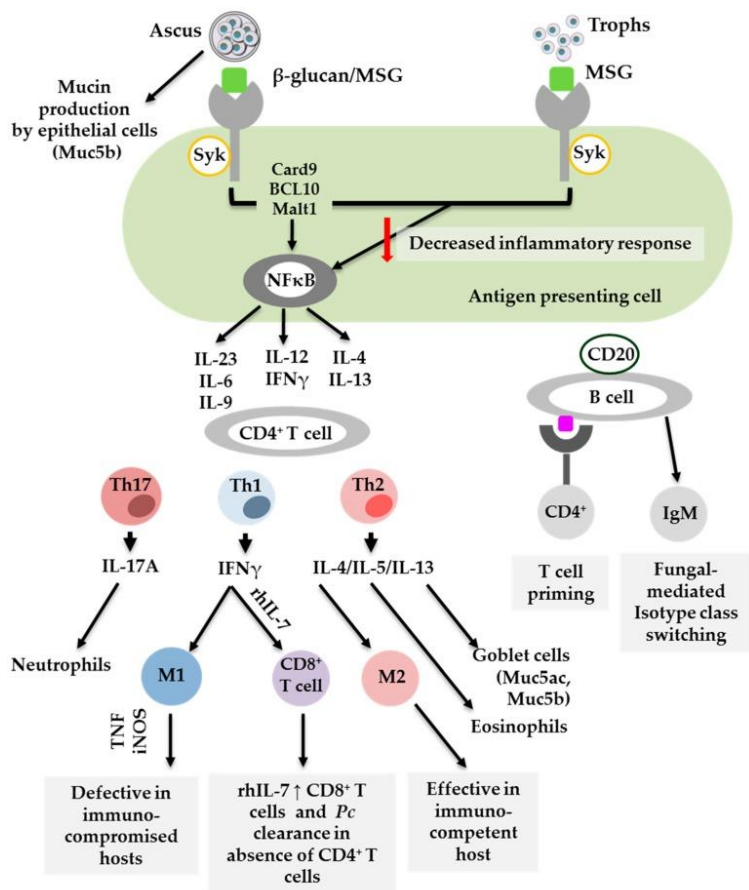


Figure 27: Schéma putatif de la réponse immune lors d'une infection par *Pneumocystis sp.* (D'après Otieno-Odhiambo et al., 2019) (250)

	Réponse physiologique	Déplétion spécifique
Lymphocytes	Augmentation au niveau pulmonaire et des ganglions (200)	- Souris SCID ou RAG2 : PCP (108,254) - Déficit héréditaire DICS : risque élevé de PCP (215,216)
Lymphocytes T CD4	Augmentation rapide au niveau pulmonaire et des ganglions (200,201)	- Ac anti-CD4 : PCP (9,221) - Facteur de risque de PCP si VIH avec CD4<200/mm3 (8,217)
Lymphocytes T CD8	Afflux au niveau pulmonaire (200) Pas d'activité fongicide des CD8 Tc1 (211,212)	- Anticorps anti-CD8 : pas de PCP, pas d'inflammation (221)
Lymphocytes B	Afflux au niveau pulmonaire mais plus tardif (200)	- Souris μ MT, Jk-/- ou anti CD20 : PCP (226-228) - Ac anti CD20 : facteur de risque de PCP (65,66,229) - Déficit en CD40 (souris et Hommes) : PCP (230,231) (226,232)
Lymphocytes T CD4 Th1	Profil de réponse augmenté mais minoritaire vis-à-vis de Th2 (200,201,204,205)	- Déficit en IFN γ isolé : pas de PCP (99,222)
Lymphocytes T CD4 Th2	Profil de réponse majoritaire des T CD4 (200,201,204,205)	- Déficit en IL4R : pas de PCP (209)
Lymphocytes T CD4 Th17	Profil de réponse augmenté mais minoritaire vis-à-vis de Th1 et Th2 (193,202). Augmenté (193,203)	- Anti IL17 : pas de PCP, clairance retardée (202,223)
Lymphocytes régulateurs		- Déficit en CD4+ CD25+ ou en IL-10 : pas de PCP (192,203,225) - Déficit héréditaire en FoxP3 : PCP (224) - Déficit en Fc γ R : pas de PCP, clairance maintenue sans inflammation (232) - Déficit en complément C5 : pas de PCP (232) - Maladie de Bruton ou déficit en STAT3 : risque faible de PCP (233-236).
Réponse humorale	Augmentée plus tardivement (200)	- Déficit en cellule NK : PCP (213)
Lymphocytes NK	Augmenté précocément (200) Activation de la réponse adaptative Activité fongicide (213)	
Macrophages	Afflux important (200) Profil majoritaire M2 (209,210) Rôle effecteur pour élimination de <i>Pneumocystis</i> (207)	- Anti TNF α : risque faible de PCP (242,243) - Déficit en récepteur TNF α : pas de PCP (99). - Déficit en voie NF κ B : risque faible de PCP (Hommes) (247,248) pas de PCP (souris) (249)
Polynucléaires neutrophiles	Augmenté (200) A priori non fongicide (241)	- Déficiences héréditaires en PNN : rares cas de PCP (240) - Déficit en infiltration tissulaire ou en activité inflammatoire des PNN : pas de PCP (241)
Polynucléaires	Augmenté (200)	- Déficit en PNE : augmentation de la charge

Tableau 1: Implication des cellules immunitaires dans la réponse immune physiologique anti-*Pneumocystis*

En Italique: expériences menées chez la souris; En souligné et gras: cellules essentielles pour la clairance de *Pneumocystis spp.*

III.3. Immunité cellulaire au cours de la pneumocystose

La PCP survient dans un contexte d'immunodépression, c'est-à-dire dans des conditions où au moins un des éléments essentiels à la lutte contre le champignon est altéré qualitativement ou quantitativement. Un enjeu important est d'identifier les réponses immunitaires secondaires mises en place dans ce contexte d'altération de l'immunité, chez l'Homme ou chez des modèles animaux. L'objectif est de déterminer, dans ces conditions d'immunodépression, les éléments de la réponse immune capables d'augmenter la clairance du champignon, et ceux responsables des lésions du tissu pulmonaire et donc des symptômes respiratoires observés au cours de la maladie.

Ainsi, dans la partie précédente (III.2), nous avons cherché à identifier quel déficit en cellule immune déclenchait une sensibilité au *Pneumocystis*, grâce à des modèles murins déplétés spécifiquement en un type cellulaire ou par l'étude des déficits immunitaires héréditaires chez l'Homme.

A l'inverse, dans l'ensemble des résultats rapportés ci-dessous, les souris étaient déplétées en au moins un des éléments essentiels décrit ci-dessus (par déplétion des LT et LB, par déplétion des lymphocytes T CD4 ou encore par corticothérapie) et développent ainsi une PCP. Les différents travaux décrit ci-dessous permettent donc d'étudier l'impact de la modification d'un ou de plusieurs éléments de la réponse immune sur l'évolution (amélioration ou aggravation) de la PCP.

Les travaux chez les rongeurs ont été accompagnés d'études cliniques sur la PCP humaine afin de rechercher de bon ou de mauvais facteurs pronostiques associés à cette maladie.

III.3.a Infiltration pulmonaire cellulaire au cours d'une pneumocystose

Lors d'une PCP chez un patient immunodéprimé, *Pneumocystis* n'est pas éliminé et une altération de la fonction respiratoire et des capacités volumiques pulmonaires se met progressivement en place chez le sujet infecté (73,108). Dans les modèles murins, l'infection à *P. murina* chez des souris déplétées en T CD4 engendre une infiltration leucocytaire bien plus forte que pour des souris immunocompétentes, avec un afflux majoritaire de T CD8 et de polynucléaires (255). La cellularité des poumons au cours de la PCP chez des souris immunocompétentes et immunodéprimées (déplétées en T CD4) est représentée dans la figure 28 ci-dessous.

Des cas de syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire (IRIS) chez des patients ou des souris immunodéprimées infectées à *Pneumocystis spp.* peuvent aussi être observés au cours de la PCP, lors d'une reconstitution immunitaire. Dans ce cas, la réponse immune est brutale avec une très forte atteinte pulmonaire et un risque élevé de mortalité.

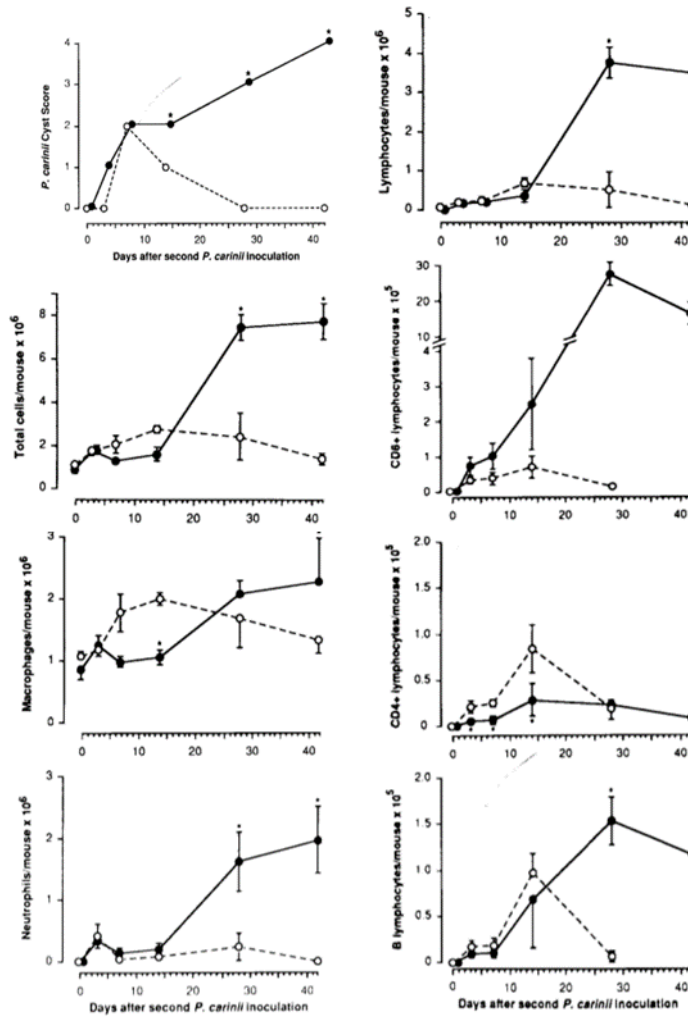


Figure 28: Infiltration cellulaire pulmonaire au cours du temps chez des souris immunocompétentes et immunodéprimées (déplétion en T CD4) infectées par *P. murina* (D'après Beck et al 1991) (255)

En trait plein : souris immunodéprimées par déplétion en T CD4
 En trait pointillé : souris immunocompétentes

III.3.b. Lymphocytes T

Chez les souris SCID (déplétées en LB et LT fonctionnels), il y a peu de lésions pulmonaires comparativement aux souris déplétées uniquement en T CD4 ou en T CD8. En revanche, une reconstitution immunitaire de ces souris induit le syndrome IRIS avec un risque important de mortalité. Une déplétion totale des LT (CD4 et CD8) avec un anticorps anti-CD3, chez ces souris SCID infectées et reconstituées après infection, a montré une nette amélioration de l'inflammation pulmonaire avec une diminution de la mortalité. Cependant, la charge fongique était augmentée en cas de déplétion des LT par rapport aux souris reconstituées sans déplétion des LT (256). Ainsi, la réponse lymphocytaire T paraît essentielle pour la lutte contre le champignon et semble également responsable de lésions dans le tissu pulmonaire.

III.3.c. Lymphocytes T CD4

Les lymphocytes T CD4 ont un rôle clé dans la réponse immune contre *Pneumocystis sp* : la reconstitution isolée de T CD4 chez des souris SCID est suffisante pour éliminer le champignon. Néanmoins, la restauration en T CD4 n'a pas que des effets bénéfiques et le transfert de ces cellules, isolé ou avec l'ensemble des cellules ganglionnaires, induit une forte inflammation aboutissant potentiellement au décès des souris infectées (257,258). La présence isolée de T CD4, sans LB et sans T CD8 s'est également montrée néfaste dans un modèle murin, sans clairance du champignon (227).

Une augmentation de la réponse Th1 au cours de la PCP a été démontrée comme étant bénéfique dans plusieurs études sur modèles murins. L'ajout d'IL12 qui stimule la différenciation des T CD4 naïfs vers le Th1 chez des souris infectées déplétées en T CD4 permet d'accélérer la clairance du champignon et de diminuer la mortalité (259). De même, l'ajout d'IFN- γ en intranasal ou par adénovirus induit un contrôle de l'infection avec élimination du champignon chez des souris déplétées en CD4 (260,261). D'un autre côté, la réponse Th1, pro-inflammatoire, est aussi pointée du doigt en tant que réponse prolongeant un état inflammatoire inadapté, toxique pour les poumons (258). Elle est associée à l'afflux de T CD8 cytotoxique et de polynucléaires dans les poumons.

Bien que la réponse Th2 soit majoritaire chez le sujet immunocompétent infecté par *Pneumocystis*, ce profil peut aussi entraîner des lésions du tissu pulmonaire et de la fonction respiratoire. L'aspect délétère de cette réponse peut potentiellement être expliqué par une surproduction de mucus, pouvant altérer les cellules épithéliales alvéolaires et pouvant réduire les échanges de gaz (205,262,263). Cette réponse est aussi associée à une possible évolution vers une fibrose péri-bronchiale et périvasculaire accompagnée d'une déstructuration du tissu alvéolaire (205,262).

Ainsi, des réponses Th1 et Th2 déséquilibrées pourraient toutes deux être responsables de troubles pathologiques. Comme l'ont montré Swain *et al*, la déplétion des LB et des T CD4 chez des souris infectées aboutit à une forte réponse Th1 en lien avec la formation d'œdème et de libération d'albumine dans les alvéoles. A l'opposé, une déplétion en LB et en T CD8 induit une réponse Th2 majoritaire qui cause une augmentation significative de la LDH (227).

Concernant le profil T CD4 régulateur, l'ajout de CD4 CD25+ chez des souris SCID infectées est bénéfique sur l'inflammation mais pas sur la charge fongique qui augmente avec ce traitement (203,264). Ces résultats sont en accord avec ceux de Ruan *et al*. qui observent une diminution de l'atteinte pulmonaire, sans modification de la clairance de *Pneumocystis*, en administrant de l'IL-10 en intratrachéal chez des souris déplétées en T CD4 (265). Par ailleurs, selon une publication de Qureshi *et al*, l'ajout d'IL-10 chez des souris déplétées en T CD4 n'a pas d'impact sur la charge fongique ou l'inflammation, mais il aggrave la clinique des souris infectées (192).

III.3.d. Lymphocytes T CD8 et réponse cytotoxique

En cas d'infection par *Pneumocystis*, le nombre de lymphocytes T CD8 est plus important dans les poumons des souris immunodéprimées que dans ceux des souris immunocompétentes, d'autant plus que la déplétion en CD4 est importante (266). Cet afflux de T CD8 dans les poumons est sujet à controverse quant à leurs effets sur l'évolution de la PCP.

Si la déplétion isolée de T CD8 chez des souris ne modifie pas la charge fongique, la déplétion surajoutée des T CD8 en l'absence de T CD4 augmente la charge fongique du champignon (108,221). Les lymphocytes T CD8 auraient par conséquent un rôle dans l'élimination du champignon en l'absence de T CD4. Ils constitueraient ainsi une voie secondaire pour la défense contre le champignon. Dans le même sens, l'augmentation du nombre de T CD8, par administration d'IL-7 chez des souris déplétées en T CD4 permet de diminuer davantage la charge fongique (267).

Dans une étude clinique chez des patients présentant des maladies auto-immunes ou des maladies inflammatoires, une diminution globale des T CD8 dans le sang périphérique est un mauvais facteur pronostic de la maladie (268).

Cependant, il a été démontré que les T CD8 avaient une activité délétère dans les poumons des souris infectées immunodéprimées déplétées en T CD4. En effet, en cas de double déplétion T CD4 et T CD8, l'inflammation et l'état clinique des souris sont moins sévères que dans le cas de déplétion isolée des T CD4 (247). La reconstitution de souris SCID par des T CD8 non spécifiques induit une baisse de la PaO₂ par rapport aux souris non reconstituées et une forte augmentation de la fuite d'albumine dans le tissu pulmonaire (266). Dans ces conditions, les T CD8 seraient principalement stimulés *via* le CMHI par les cellules du tissu endothélial ou épithélial et non par les CPA (cellules dendritiques, macrophages, monocytes). Cela aboutirait à la présence importante de T CD8 effecteurs dans les poumons (266).

L'infiltration pulmonaire de T CD8 chez les souris infectées déplétées en T CD4 est, au moins en partie, liée à la production d'IFN de type I et de TNF α . En cas de déplétion en récepteur de ces cytokines, il y a moins de T CD8 au niveau pulmonaire et les lésions pulmonaires s'en trouvent améliorées, sans impact sur la charge fongique (205).

Par ailleurs, contrairement aux T CD4, l'ajout de T CD8 stimulés (prélevés à partir de souris immunocompétentes infectées) chez des souris SCID infectées n'améliore pas la clairance du champignon et augmente les lésions pulmonaires (269).

Mc Allister *et al.* ont également montré un effet délétère d'un transfert de lymphocytes T CD8 chez des souris SCID infectées. Néanmoins, lorsqu'ils transféraient des cellules T CD8 polarisées Tc1

(cytotoxique), le souris SCID étaient alors protégées de l'infection (211). Ainsi, un profil de réponse Th1 des T CD4 et Tc1 des T CD8 a un effet protecteur sur la PCP en augmentant la clairance du champignon.

III.3.e. Réponse humorale

L'infection à *P. jirovecii* induit la production d'Ac spécifiques qui sont mesurables dans le temps. Des essais de thérapie anti-*Pneumocystis* reposant sur l'administration d'Ac spécifiques, ont été réalisés sur le modèle murin. Ceux-ci ont démontré que les Ac permettent de diminuer significativement la charge fongique tout en diminuant l'inflammation pulmonaire des souris traitées (257,270). Cependant, le champignon n'était pas complètement éliminé et à la levée du traitement humoral, la charge fongique augmentait à nouveau avec la réapparition de la maladie pulmonaire (270).

Rapaka *et al* ont montré l'intérêt des Ac dans l'élimination du champignon par opsonisation chez des souris immunodéprimées. En effet, l'introduction d'une protéine de fusion Dectin-1/Fragment Fc des Ig1 de souris (anticorps qui se fixe sur les BDG), a conduit à une amélioration de l'élimination de *P. murina* malgré l'absence de T CD4 et de LB, grâce à une meilleure prise en charge par les macrophages pulmonaires (271).

III.3.f. Macrophages

Par opposition aux rats immunocompétents infectés par *P. carinii* qui possèdent principalement des macrophages polarisés M2, les macrophages chez les rats immunodéprimés par corticothérapie sont en majorité de polarisation M1 (210). Les deux types de macrophages M1 et M2 ont prouvé leur efficacité *in vitro* et *in vivo* à phagocyter et à éliminer le champignon (210,254). Toutefois, l'ajout de macrophages M2 chez des souris infectées immunodéprimées induit beaucoup moins d'inflammation que l'ajout de macrophages M1 (210,272) tout en éliminant le champignon. L'orientation vers une polarisation M1 ou M2 est influencée par les cytokines Th1 (IFN- γ ou TNF α) ou Th2 (IL4 ou IL13), respectivement (209,210). L'orientation des macrophages vers une réponse M2 s'est avérée bénéfique chez des souris immunodéprimées infectées (247,273), même en l'absence de T CD4 (273).

L'augmentation du nombre de macrophages pulmonaires et de leur activité fongicide par addition de GM-CSF dans les poumons de souris infectées déplétées en T CD4 induit une nette amélioration de l'élimination du champignon et une diminution de l'inflammation. A l'inverse, la déplétion en GM-CSF chez des souris immunodéprimées infectées augmente la charge fongique et l'inflammation pulmonaire (274).

En dehors de leur activité phagocytaire, les macrophages produisent également des cytokines chémoattractantes. Il est notamment le principal producteur de TNF α . En cas de déplétion en récepteurs de TNF α (TNRF I et II) chez des souris infectées et déplétées en T CD4, on observe une

diminution de production de chémokines telles que MCP-1 ou RANTES ainsi qu'une diminution importante de l'infiltration pulmonaire en T CD8 et en PNN. Ceci a pour effet de diminuer l'inflammation comme les lésions pulmonaires et l'atteinte clinique liée à la maladie (275).

III.3.g. Polynucléaires neutrophiles

Une forte infiltration de PNN dans les poumons de patients atteints de PCP, infectés ou non par le VIH, s'est révélée être un mauvais facteur pronostique de la maladie (276–278). Elle est généralement associée à une augmentation de la LDH et à une diminution du nombre de macrophages dans les poumons (276,278).

L'IL-8 joue un rôle important dans l'attraction des PNN vers les poumons car sa neutralisation conduit à une réduction de moitié du nombre de PNN pulmonaire. Il a également été montré que de hauts niveaux d'IL-8 étaient un facteur associé à un mauvais pronostic de la PCP chez les patients infectés par le VIH (279).

Bien que Swain *et al* trouvent une corrélation entre la concentration de PNN dans les poumons et la sévérité de la maladie (évaluée par la compliance des poumons), ils n'ont pas identifié de toxicité directe des polynucléaires sur le tissu pulmonaire en cas de PCP. En effet, la diminution du nombre de PNN dans les poumons (sans impact sur les CD8 ni sur les macrophages) ou la suppression de la production d'espèces superoxydes par les PNN chez des souris déplétées en T CD4, n'améliore pas les lésions tissulaires ou la fonction respiratoire. Par ailleurs, ces altérations du nombre ou des fonctions des PNN ne modifient pas non plus la charge fongique par rapport aux souris sauvages, confirmant l'absence d'activité cytotoxique des PNN sur *Pneumocystis sp.* (241).

III.3.h. Polynucléaires éosinophiles

La stimulation des PNE par ajout d'IL5 avant infection chez des souris déplétées en T CD4 ou complètement déficientes en lymphocytes, aboutit à une meilleure clairance du champignon à 14 jours post-infection, sans augmentation de la réponse Th2. La forte corrélation alors trouvée entre le nombre de PNE dans les poumons et la charge fongique a été confirmée par l'absence de bénéfice obtenu après ajout d'IL-5 en cas de déplétion en PNE (106).

	Effet sur la charge fongique	Effet sur l'inflammation et la clinique
Lymphocytes T	Nécessaire pour la clairance (256)	Responsable d'inflammation (108,256)
Lymphocytes T CD4	Nécessaire pour la clairance du champignon (257,258)	Responsable d'inflammation (227,258)
Lymphocytes T CD8	Diminution de la charge fongique mais pas suffisant (221,267)	Responsable d'inflammation (247,269)
Lymphocytes B	/	/
Lymphocytes T CD4 Th1	Diminution de la charge fongique (259–261)	Responsable d'inflammation(258)
Lymphocytes T CD4 Th2	/	Délétères si trop de production de mucus et par le risque de développement de fibrose (205,262,263)
Lymphocytes T CD4 Th17	/	/
Lymphocytes T régulateurs	Pas de modification de la charge fongique (203,264,265)	Diminution de l'inflammation pulmonaire (203,264,265)
Lymphocyte T CD8 cytotoxiques (Tc1)	Diminution de la charge fongique (211)	Diminution de l'inflammation pulmonaire(211)
Réponse humorale	Diminution de la charge fongique mais pas suffisant (257,270) Activité directe d'opsonisation avec les macrophages phagocytaires (271)	Diminution de l'inflammation pulmonaire (257,270)
Lymphocytes NK	/	/
Macrophages	Diminution de la charge fongique (274) Polarisations M1 et M2 fongicides (210,272)	Polarisation M1 plus inflammatoire que la polarisation M2 (210,272) Diminution de la production de TNF α : moins d'inflammation pulmonaire (275)
Polynucléaires neutrophiles	Pas d'effet sur la charge fongique (241)	Mauvais marqueur pronostique (276–278) Pas de toxicité directe prouvée (241)
Polynucléaires éosinophiles	Diminution de la charge fongique (106)	/

Tableau 2: Effet des différentes cellules immunitaires sur la charge fongique et sur l'inflammation pulmonaire au cours de la PCP.

D'après l'ensemble de ces données, la réponse immune au cours d'une PCP nécessite un équilibre entre les différentes populations cellulaires et entre le profil de réponse. En effet, en dehors des PNN qui sont corrélés avec une gravité de la maladie, sans bénéfice apporté connu, et les Ac qui ne semblent pas avoir d'effets négatifs, les autres acteurs de l'immunité ont à la fois un effet négatif et positif selon que l'on étudie préférentiellement la charge fongique ou l'inflammation pulmonaire et la clinique associée.

III.4. Lipides de l'inflammation au cours de la pneumocystose

III.4.a. Lipides pro-inflammatoires

Les lipides de l'inflammation ont été très peu décrits au cours de la PCP, le focus ayant porté davantage fait sur les populations lymphocytaires.

Toutefois, l'infection à *P. carinii* a un impact sur le métabolisme des lipides. Il a été montré en *ex-vivo* qu'en présence de *Pneumocystis sp*, la PLA2 des macrophages alvéolaires est stimulée et augmente la production de l'ARA et aussi de la prostaglandine E2 (PGE2) et du leucotriène B4 (LTB4) (280). Par ailleurs, la quantité de PGE2 produite peut être modifiée par la réponse humorale environnante (280). Chez le rat, l'activité de la PLA2 a été également augmentée en présence du champignon dans un contexte d'immunodépression (281).

La composition du LBA en phospholipides est également modifiée par l'infection (230). Ce changement de composition en lipide peut induire une modification des surfactants pulmonaires pouvant être délétère pour le tissu et la fonction pulmonaire (281).

Chez l'Homme, Benfield *et al.* ont mesuré la concentration de certains lipides de l'inflammation dans le LBA de patients VIH-positifs atteints de PCP. Ils ont tout d'abord constaté une élévation du LTB4 et de l'IL8 (tous deux chemo-attractants des PNN) chez les patients malades en comparaison à des patients HIV négatifs non infectés par *P. jirovecii*. La quantification de l'expression de la PLA2 a révélé une corrélation entre la PLA2 et l'IL8 et avec l'infiltration de PNN dans les poumons des patients atteints de PCP. De plus, les taux de LTC4, PGE2, PGF2 et 5 HETE n'ont pas montré de corrélation avec la sévérité de la PCP évaluée par le PaO2 (283).

III.4.b. Lipides pro-résolutifs de l'inflammation (SPM)

A notre connaissance, les SPM n'ont jamais été étudiés au cours de la PCP, que ce soit dans le modèle murin ou chez l'Homme.

Néanmoins, compte tenu de la puissante inflammation toxique retrouvée lors d'une PCP, on peut imaginer que les SPM et la résolution de l'inflammation soient dérégulés au cours de cette maladie. Il pourrait aussi s'agir d'une voie thérapeutique intéressante afin de limiter l'afflux de nouvelles cellules inflammatoires dans les poumons infectés, tout en stimulant la phagocytose du *Pneumocystis* et des PNN apoptotiques.

Objectifs

La pneumocystose est une infection fongique opportuniste fréquemment observée chez les patients infectés par le VIH mais aussi chez les patients atteints de cancers ou greffés d'organe solides. De plus, la mortalité élevée de cette pneumopathie, en dépit d'un traitement anti-*Pneumocystis* adapté, accentue l'importance de mieux comprendre la physiopathologie de la maladie afin d'en améliorer la prise en charge.

La pneumocystose est une pathologie éminemment liée à la réaction inflammatoire de l'hôte infecté. La réponse immune peut en effet être suffisante pour éliminer *Pneumocystis* mais elle est aussi impliquée dans les lésions du tissu pulmonaire et dans la dégradation de la fonction respiratoire.

Dans ce contexte, les objectifs de ce travail de thèse sont:

- a) de mieux comprendre le rôle des différentes populations lymphocytaires dans la PCP, en analysant largement les sous-populations des T CD4 et des T CD8 au cours des infections à *Pneumocystis*
- b) d'évaluer l'implication des médiateurs lipidiques de l'inflammation au cours des infections à *Pneumocystis* et notamment de décrire pour la première fois, l'évolution des lipides pro-résolutifs de l'inflammation en conditions physiologiques et pathologiques.

Les résultats de deux études cliniques et une étude sur un modèle murin seront présentés dans ce manuscrit pour répondre à ces objectifs.

Partie 2 : Travaux de recherche

La réponse immune lymphocytaire est primordiale au cours d'une infection par *Pneumocystis sp.* Elle est à la fois essentielle pour l'élimination de *P. jirovecii* mais est aussi responsable des lésions du tissu pulmonaire en condition d'immunodépression (4).

Le rôle précis des différentes populations lymphocytaires au cours de la maladie reste indéterminé (5). Bien que de nombreuses études montrent que les T CD4 sont des cellules essentielles à la défense contre le champignon, le profil des T CD4 helper ayant un rôle plutôt bénéfique ou à risque dans la maladie, n'est pas connue. Par ailleurs, le rôle des autres populations lymphocytaires est controversé, notamment pour les T CD8, ou peu connu pour les lymphocytes B et NK. De plus, si un grand nombre de travaux sur l'inflammation au cours de la PCP ont été réalisés sur modèles murins, les études cliniques chez l'Homme restent généralement limitées aux populations globales de lymphocytes T, T CD4 et T CD8, qui peuvent être obtenues dans le suivi biologique standard de patients hospitalisés.

Compte tenu de l'importance de la réponse lymphocytaire dans le développement de la PCP, une meilleure compréhension du rôle des différents types lymphocytaires semble importante et pourrait permettre d'améliorer la prise en charge de la maladie.

Les travaux présentés ci-après avaient ainsi pour objectif de réaliser un immunophénotypage élargi des populations lymphocytaires afin d'évaluer l'implication des différentes sous populations des T CD4, T CD8, lymphocytes B et NK au cours de la PCP. Ces populations lymphocytaires ont été comparées entre des sujets immunodéprimés infectés ou non infectés par *P. jirovecii*. Puis, dans un second temps, les sous-populations lymphocytaires ont été comparées entre patients malades survivants ou décédés et des seuils prédictifs, associés à une augmentation du risque de mortalité ont été recherchés.

Article 1: Identification de facteurs de risque de Pneumocystose sévère par immunophénotypage des lymphocytes sanguins périphériques chez l'Homme

**Blood circulating lymphocyte phenotyping identifies risk factors for severe
*Pneumocystis pneumonia***

Eléna Charpentier^{1,2}, Catherine Marques², Sandie Ménard², Pamela Chauvin¹, Emilie Guemas², Sophie Cassaing¹, Judith Fillaux¹, Alexis Valentin¹, Nicolas Blanchard², Antoine Berry^{1,2}, Xavier Iriart^{1,2}.

¹: Department of Parasitology-Mycolology, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

²: Center for Pathophysiology Toulouse Purpan (CPTP), Inserm, CNRS, University of Toulouse III, UPS, Toulouse, France

Running title: Lymphocyte subpopulations in *Pneumocystis pneumonia*

ABSTRACT

The host lymphocyte response to infection is decisive in *Pneumocystis* pneumonia (PCP) development and evolution. Except for the global major implication of CD4 T cells, little is known on the exact roles of lymphocyte subpopulations in fungal control and pathogenicity. This clinical study aimed to compare circulating lymphocyte populations in the context of PCP.

Peripheral NK, NKT, B, T CD4+ and T CD8+ subpopulations were compared by immunophenotyping between a group of patients diagnosed with PCP [PCP(+)] and an uninfected group [PCP(-)] matched with the former for the type of immunosuppression. Among PCP(+) subjects, the lymphocyte populations were also compared between surviving and deceased patients.

From 2016 to 2018, 19 and 20 patients were included in the PCP(+) and PCP(-) groups, respectively. More PCP(+) patients had low B cell count (<40 cells/ μ L) compared to PCP(-) group, whereas there was no difference for the threshold of CD4 <200 cells/ μ L. Among the PCP(+) group, the 7 deceased patients (37%) had lower Th1 and Tc1 profiles, higher Th2 response, higher effector T CD8 cells, lower central memory T CD8 and reduced NK cells compared to the 12 survivors. A Th1/Th2 ratio <17, Tc1 <44%, effector T CD8 <25%, central memory T CD8 <4%, NK cells <50 cells/ μ L and total lymphocytes <0.75 G/L were associated with a high risk of mortality.

In conclusion, B cell count could be a tool for helping predict the risk of PCP while reduced protective Th1 or Tc1 response, low lymphocyte count, and excessive effector CD8 population could constitute predictive markers of severity during PCP.

Keywords: *Pneumocystis*, pneumocystosis, inflammation, lymphocyte, Th1/Th2 cells, human

INTRODUCTION

Pneumocystis pneumonia (PCP) is an opportunistic fungal disease which induces severe hypoxia and potentially life-threatening respiratory distress syndrome. Although it remains one of the most frequent AIDS-defining infection, PCP incidence is increasing among non-HIV subjects, suffering from other conditions associated with immunosuppression such as solid organ transplants, blood or solid cancers, or inflammatory diseases (1,2). In spite of an adapted antimicrobial treatment that restricts fungal growth, mortality is estimated at 20 to 30% with variations depending on underlying diseases (1,3,4).

PCP pathophysiology remains poorly understood. However, it is generally accepted that the lung lesions observed during the disease are largely due to an unsuitable host immune response. Lymphocyte have a key role in the disease development. They are paradoxally required to clear the fungus but they are also implicated in the lung lesions (5,6).

CD4 T cells are known to have a major role in the defense against *Pneumocystis* and a count below 200 cells/ μ L increase the risk of PCP in HIV-positive patients. Yet, this threshold of 200 cells/ μ L is not as reliable for HIV-negative patients (7). In addition, the actual subpopulations of CD4 T cells that beneficial to eliminate *Pneumocystis jirovecii* without inducing lung lesions are still not identified. For instance, concerning the CD4+ T helper (Th) subsets, some studies on murine models associated an increased Th1 response with an improvement of PCP (8,9) while other studies described a beneficial Th2 subset (10). The usual anti-fungal Th17 subset has been described in mice to increase during PCP but is not necessary to clear the lung infection (11). Regulatory T cells could also have an important role in the control of the lung inflammation, as shown in some murine experiments (12,13).

CD8 T lymphocytes have a controversial role in PCP. Some studies showed a potential role of these cells in the late phase of fungus clearance in absence of CD4 T cells (8,14). However, other studies connected an opposite pathological effect on alveoli to the CD8 T cell influx in the lungs (5).

B lymphocytes might also play a key role during PCP, as suggested by the PCP susceptibility in patients treated by rituximab (anti-CD20) (15,16) and in B-cell depleted mice (17). Their role could not only be related to the production of antibodies but also to their implication in presenting antigens and maintaining CD4 T cell responses. Few studies focused on the role of NK cells in PCP (18). Kelly *et al* showed higher fungal load in NK-depleted mice compared to wild type mice (19). Concerning other immune cells, macrophages and their phagocytic ability have been studied as final effector cells in the fungus clearance (20). Neutrophil polymorphonuclear actions on *Pneumocystis* are mainly considered limited and their influx in the lung are frequently related to PCP severity (6,21).

Considering the severity of the disease, a better understanding of host immune response in PCP pathophysiology as well as the determination of suitable risk factors and prognostic factors for all

patients are required. There are currently very few publications globally studying the different lymphocyte subpopulations in patients suffering from *Pneumocystis* pneumonia, most of the studies being done on mice and on a limited number of lymphocyte populations.

This work aimed to describe both CD4 and CD8 T cell subpopulations as well as B cells and NK cells in peripheral blood during *Pneumocystis* infection and to compare those populations in immunosuppression-matched uninfected subjects. A second objective is to compare, among PCP(+) patients, the levels of lymphocyte subpopulations according to the evolution of the disease (survivors *versus* deceased patients).

MATERIEL AND METHODS

Subject inclusions

From August 2016 to September 2018, adult patients (over 18 years old) diagnosed with *Pneumocystis* pneumonia [PCP(+)] in Toulouse University Hospital were included in the study. PCP diagnosis was made upon the argument of a positive *P. jirovecii* qPCR in a respiratory sample associated with PCP-compatible symptoms (i.e dyspnea, fever and/or cough) and a PCP-compatible imaging (ground glass opacities or anomalies of interstitial lung tissue). DNA extraction and the consecutive qPCR for *P. jirovecii* diagnosis were performed on sputum, tracheal-aspirations or broncho-alveolar lavages (BAL) as previously described by Fillaux *et al* 2008 (22). Patients that did not receive an anti-*Pneumocystis* treatment were excluded from the study *a posteriori*. There was no exclusion in relation to the cause of immunosuppression. A group of PCP-negative subjects [PCP(-)] was constituted from patients with a negative *P. jirovecii* PCR in respiratory samples. Patients from this group were selected in order to have a matched immunosuppression cause with the PCP positive patients.

Blood samples of all included patients were obtained from standard diagnosis on the basis of the physicians' prescriptions for white blood cell analysis, in the day of the diagnosis or in the three following days; no blood sample was drawn only for the purpose of the study and there was no other assay than the analysis of leukocyte levels. Patient characteristics were obtained from a non-interventional review of medical charts and laboratory results of the patients and all data were made anonymous for analysis. According to the French public health law (23), this type of protocols does not require approval from an ethics committee and is exempt from the requirement for formal informed consent.

A group of healthy subjects without known immunosuppression factors, was added in order to have reference normal values of the different lymphocyte subpopulations. Subjects were selected from a bank of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) which gather anonymously PBMC from healthy

blood donors (French Blood Establishment-EFS). Those subjects' PBMC were selected to match the global sampling of PCP positive and negative patients on the parameters of gender and age.

PBMC isolation and storage

Patient blood samples were collected with EDTA blood tubes (BD Vacutainer® 5ml). The peripheral blood was diluted for a 1:1 ratio with 1X Phosphate Buffered Saline (1X PBS) (Sigma-Aldrich) and deposited on a lymphocyte separation medium (Ficoll-Human density 1.077g/ml - PAN Biotech, Germany) before centrifugation for 20 min at 350g. The interface between plasma and ficoll containing PBMC was harvested, washed twice with 1X PBS (Sigma-Aldrich). After staining with trypan blue (0.4%) (Gibco, USA), a cell count was carried out to verify the cell viability. Obtained cells were then resuspended in a cryopreservation medium containing fetal calf serum (FCS, Gibco) and dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich) in a ratio of 9:1 and were frozen by step, in 80°C freezer and then in liquid nitrogen for storage until the immunophenotyping analysis.

Leukocyte numeration and profile

Leukocyte numeration and profile were obtained from the routine care of the patient. They were determined in the Hematology laboratory of Toulouse teaching hospital. Whole blood leukocyte count was acquired on an automatic Sysmex XN cytometer (Sysmex Corporation, Kobe, Japan). The proportions of polymorphonuclear leukocytes, lymphocytes, monocytes, eosinophils and basophils were obtained automatically with the same automatic cytometer Sysmex XN with a microscopic control whenever it was required. Leukocyte numeration and profile were not performed on anonymous healthy control subject for whom only PMBCs were available.

Flow cytometry for lymphocyte phenotyping

Lymphocyte subpopulations were determined immunophenotypically with a panel containing 14 antibodies: CD3-APCH7, CD4-BV786, CD8 α -BV711, CD19-BV510, CD25-BV421, CD45RA-PE-Cy7, CD56-BV605, CD127-AF647, CD183-BB700, CD194-BV650, CD196-PE CF594, CD197-BB515, Foxp3-PE and a viability marker (FVS-APC R700). All antibodies were produced by BD Biosciences (Heidelberg, Germany) and were titrated beforehand. For the flow cytometry analysis, PBMCs were thawed in a water bath at 37°C and then immediately re-cultured in RPMI Medium 1640 1X medium (Gibco) with 10% human serum (obtained from the French Blood Establishment-EFS service in Toulouse-Purpan), 1mM sodium pyruvate (Sigma), 2mM L-glutamine (Invitrogen). A total of 500 000 cells were transferred to a 96-V-bottom-plate (or the whole PBMC aliquot when there was an insufficient number of cells). After a saturation of all non-specific sites in the presence of pure human serum and dead cell detection by the viability dye, cells were stained with surface antibodies (all antibodies detailed above except the anti-FoxP3 and Viability dye). Cells were then fixed and permeabilized with the Transcription Factor

Buffer (BD Biosciences) in accordance to manufacturer's instructions before the FoxP3 staining. Finally, cells were resuspended in PBS+5% human serum before analyzing. For all experiments, acquisition was performed using LSR-Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed using Flowjo software (version 10). The gating strategy is detailed in supplementary data (Figure S1). Auto-fluorescence controls and fluorescence minus one controls (FMO) were performed to improve the analysis of poorly expressed markers and the experiments were standardized to guarantee reproducible and comparable results from different experiments. In order to avoid uncertain gating, CD4 and CD8 subpopulations were not analyzed in subjects with lower than 500 CD4 cells or 500 CD8 cells.

Statistical analysis

Statistical analysis of patients' characteristics and lymphocyte subpopulations were performed using GraphPad Prism version 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA). A chi2 test or a Fisher's exact test (when Chi2 conditions were unfulfilled) was used to compare the clinical data and the qualitative analysis of lymphocyte subpopulations between groups. A non-parametric Mann-Whitney test was used to compare the distribution of leukocyte population and the levels of lymphocyte subpopulations between the different groups of interest. Kruskal Wallis's test was used to compare lymphocyte populations of PCP(+), PCP(-) and control healthy group. ROC curves were performed and compared with Delong's test on R software with the "pROC" package (24). Kaplan Meier survival analysis were performed and compared with the Mantel-cox test on GraphPad Prism version 5.0 software. The differences were considered significant with a value of $p < 0.05$ and were underlined in the tables.

RESULTS

Patient's characteristics

Between 2016 and 2018, 43 subjects from Toulouse Teaching Hospital were included. Among them, 23 were classified among PCP(+) patients and 20 in PCP(-) patients. Four patients were excluded from the PCP(+) group because they did not receive any curative treatment against *P. jirovecii*. Samples from 20 healthy blood donors were also analyzed in order to have a range of normal values in immunocompetent condition. Patients' clinical characteristics for each group are detailed in Table I. There was no significant difference in terms of age or gender between the 3 groups.

Clinical characteristics were compared between the groups of patients having PCP and patients without PCP matched for their immunosuppression causes. Immunosuppression conditions were various with HIV infection, cancer treated with chemotherapy (gathering hematological or solid cancers), inflammatory diseases and immunosuppression following solid organ transplants or bone marrow grafts. In both groups, the distribution of underlying diseases was comparable. An important

proportion of patients in the two groups received corticosteroids [74% in the group of PCP(+) and 45% in the group of PCP(-), $p=0.07$]. When considering the cumulative dose of corticosteroids received in the two months preceding the inclusion, there were significantly more patients with a dose superior to 3000 mg of prednisone or equivalent (i.e 50mg/ day) in the PCP(+) group than in the PCP(-). Among the PCP(-) patients, 5 (20%) had received cotrimoxazole (sulfamethoxazole-trimethoprim) prophylaxis in the month preceding the respiratory sample while none of the patients from the PCP(+) group received prophylaxis ($p=0.05$). As expected, there were more patients with dyspnea ($p=0.01$), fever ($p<0.01$) and PCP-compatible imaging ($p<0.01$) in PCP(+) group than in PCP(-) group. There were also more patients requiring high-flow oxygen therapy in the group of PCP(+) ($p<0.01$), without difference in global mortality at 2 months.

Lymphocyte subpopulations in PCP-positive versus PCP-negative subjects

All the 19 PCP(+) and 20 PCP(-) patients were analyzed for the leukocyte, T CD4, T CD8, B and NK lymphocyte counts. Nevertheless, considering the threshold criteria allowing the analyses of lymphocyte sub-population, CD8 subpopulation analysis was not possible for one PCP(+) patient and both CD4 and CD8 subpopulations were not analyzed for two PCP(-) patients. Patients' lymphocyte subpopulations are detailed in Table I. Between PCP(+) and PCP(-) groups, there was no significant differences in the counts and proportions of total lymphocyte, total T CD4, T CD8, B and NK lymphocytes, nor in the T CD4, T CD8 and NK lymphocyte subpopulation. Although there was a trend of increased CD8 T cells in patients with PCP compared to patients without PCP [34.3% of CD3+ cells for PCP(+) against 17.1% in PCP(-)], the difference was not significant ($p=0.08$).

However, more patients in PCP(+) group had a B lymphocyte count <40 cells/ μ L in comparison to PCP(-) patients ($p=0.04$) and CD4/CD8 ratio was more frequently <3 in PCP(+) patients ($p=0.04$). There was no significant difference between the two groups for the usual CD4 threshold of 200 cells/ μ L.

The proportions of lymphocyte subpopulations in control healthy patients and their comparison to PCP(+) and PCP(-) groups are detailed in supplementary data (Supplementary Table SI). There was a significant difference in the CD4 T helper and CD8 polarization with lower Th1/Th2 ratio in the two immunosuppressed groups compared to healthy patients ($p<0.05$ for PCP(-) group and $p<0.01$ for PCP(+) group).

	PCP (+)	PCP (-)	p-value
n patients	19*	20**	
Median age (years) [min; max]	65 [30; 78]	58 [35; 77]	0,28
Sex ratio (M/F)	2,2 (13/6)	1,2 (11/9)	0,39
Immunosuppression condition			
Solid organ transplant	5 (26%)	5 (25%)	0,93
Cancer with chemotherapy***	6 (31,5%)	7 (35%)	0,82
Bone marrow graft	2 (10,5%)	2 (10%)	1,00
Inflammatory disease	3 (16%)	3 (15%)	1,00
HIV-positive	3 (16%)	3 (15%)	1
Corticosteroid therapy			
2 months cumulative dose >3000mg prednisone or equivalent	5 (26%)	0 (0%)	<u>0,01</u>
Bactrim prophylaxy	0 (0%)	5 (20%)	<u>0,05</u>
Positive CMV PCR (blood and/or BAL)	6 (32%)	4 (20%)	0,48
Other/Co-infections			
Bacteria	10 (53%)	9 (45%)	0,63
Viruses	10 (53%)	6 (30%)	0,15
Fungi	6 (32%)	4 (20%)	0,48
Clinical signs and hospital care			
Fever	15 (79%)	6 (30%)	<u><0,01</u>
Cough	12 (63%)	6 (30%)	<u>0,06</u>
Dyspnea	17 (89%)	10 (50%)	<u>0,01</u>
Ground glass or interstitial infiltrates on CT scan	18 (95%)	10 (50%)	<u><0,01</u>
Intensive care admission	10 (53%)	6 (30%)	0,2
Mechanical ventilation/ High-flow O2	11 (58%)	3 (15%)	<u><0,01</u>
2-months mortality	7 (37%)	3 (15%)	0,15
	Medians, [Interquartil intervals]		p-value
n leukocytes (G/L)	5,6 [3,9; 13,6]	5,2 [2,5; 12,8]	0,99
n lymphocytes (G/L)	0,8 [0,6; 1,5]	0,9 [0,4; 1,7]	0,91
n neutrophils (G/L)	3,9 [2,1; 8,9]	4,2 [1,6; 10,0]	0,83
n eosinophils (G/L)	0,1 [0,0; 0,1]	0,1 [0,0; 0,2]	0,74
n basophils (G/L)	0,1 [0,0; 0,1]	0,1 [0,0; 0,1]	0,9
n monocytes (G/L)	0,4 [0,1; 0,9]	0,7 [0,1; 1,0]	0,77
n T lymphocytes (cells/μL)	531 [288; 1033]	551 [179; 1324]	0,99
T lymphocytes (% lymphocytes)	67,0 [52,4; 81,9]	66,0 [40,4; 82,9]	0,64
n T CD4 (cells/μL)	346 [100; 596]	331 [89; 998]	0,83
n T CD4 <200 cells/μL	7 (37%)#	9 (45%)#	0,60
T CD4 (% CD3)	58,6 [42,5; 76,9]	73,5 [55,8; 86,3]	0,27
Naive CD4 (%CD4)	24,9 [7,5; 49,6]	23,2 [4,2; 62,7]	0,99
Effector CD4 (%CD4)	2,0 [1,1; 4,3]	2,2 [1,2; 4,2]	0,87
Effector memory CD4 (%CD4)	27,9 [19,0; 50,7]	35,2 [14,1; 52,1]	0,82
Central memory CD4 (%CD4)	30,5 [22,3; 42,2]	30,6 [23,5; 39,9]	0,82
Th1 CD4 (%CD4)	12,6 [7,2; 29,1]	13,2 [8,9; 21,5]	0,94
Th2 CD4 (%CD4)	0,6 [0,3; 1,2]	0,4 [0,2; 1,0]	0,35
Th17 CD4 (%CD4)	0,4 [0,2; 0,8]	0,3 [0,1; 0,5]	0,48
Th1-Th17 CD4 (%CD4)	4,5 [1,6; 9,1]	5,3 [2,4; 9,4]	0,77
Th9 CD4 (%CD4)	5,5 [4,0; 11,7]	7,4 [2,8; 14,6]	0,66
CD4 Treg (%CD4)	4,7 [2,9; 8,2]	4,3 [3,9; 7,9]	0,61
Ratio Th1/Th2	20,3 [9,2; 45,0]	29,5 [13,2; 49,1]	0,48
Ratio Th17/Treg	0,07 [0,04; 0,16]	0,06 [0,02; 0,08]	0,19
n T CD8 (cells/μL)	125 [58; 363]	60 [31; 131]	0,16
T CD8 (% CD3)	34,3 [15,6; 47,8]	17,1 [8,8; 25,9]	0,08
Naive CD8 (%CD8)	13,7 [4,0; 33,6]	19,3 [7,0; 33,4]	0,46
Effector CD8 (%CD8)	21,3 [16,2; 38,2]	30,8 [14,3; 48,4]	0,69
Effector memory CD8 (%CD8)	42,4 [16,9; 73,8]	36,6 [25,9; 48,9]	0,67
Central memory CD8 (%CD8)	6,1 [2,5; 11,2]	6,0 [2,9; 8,1]	0,96
FoxP3+ CD8 (% CD8)	0,1 [0,00; 0,2]	0,1 [0,0; 0,4]	0,24
Non naive Tc1 CD8 (% CD8)	45,5 [35,3; 70,8]	49,7 [34,7; 61,3]	0,48
Non naive Tc2 CD8 (% CD8)	1,1 [0,8; 2,0]	1,5 [1,0; 2,0]	0,38
Non naive Tc9 CD8 (% CD8)	0,2 [0,1; 0,4]	0,3 [0,1; 0,7]	0,41
Ratio CD4/CD8	1,7 [0,9; 4,7]	4,6 [2,0; 9,7]	0,13
n B lymphocytes (cells/μL)	32 [5; 216]	67 [14; 287]	0,29
n B lymphocytes <40 cells/μL	12 (63%)#	5 (25%)#	0,04
B lymphocytes (% lymphocytes)	4,0 [0,9; 17,4]	12,5 [2,6; 21,4]	0,22
n NK lymphocytes (cells/μL)	57 [31; 146]	59 [21; 81]	0,44
NK lymphocytes (% lymphocytes)	11,7 [7,0; 34,6]	3,4 [1,6; 9,2]	0,31
NK CXCR3+ (% NK)	8,3 [6,4; 15,5]	9,9 [7,1; 18,8]	0,59
n NK T lymphocytes (cells/μL)	26 [11; 80]	20 [8; 50]	0,36
NK T lymphocytes (% lymphocytes)	3,2 [1,4; 5,3]	2,1 [0,9; 7,8]	0,36
NK CD4 (% NK T)	11,8 [6,1; 20,7]	15,2 [3,0; 31,0]	0,81
NK CD8 (% NK T)	46,3 [24,5; 64,5]	45,2 [34,8; 53,4]	0,70

Table 1: Clinical characteristics and lymphocyte immunophenotyping in PCP positive or negative subjects.

*: 18 subjects for CD8 subpopulations, **: 18 subjects for CD4 and CD8 subpopulations, ***: contains hematological and solid cancers, #: number of patients below the corresponding threshold (percentage in the group).

Lymphocyte subpopulations in deceased subjects *versus* survivors

Among the PCP(+) group, 12 (63%) patients evolved favorably whereas 7 (37%) subjects died with respiratory failure. The lymphocyte subpopulation profiles were compared between the groups of survivors and the group of deceased patients. All results are detailed in Table II.

There was no significant difference among the two groups concerning age or gender, nor in the immunosuppression cause. The fungal load and the co-infection proportion were not significantly different between the 2 groups despite a trend to a higher proportion of bacterial co-infection in the group of deceased patients.

Concerning the leukocyte numeration and profile, the number of lymphocytes was lower in the group of deceased patients (0.6 G/L) in comparison to the survivor one (1.2 G/L) but the difference was not significant ($p=0.0624$). There was also a trend for a reduced eosinophil number in the deceased group, but the cell counts were very low for the two groups.

Focusing on the CD4 T cells, there was no significant difference in the global population but the proportion of Th1 cell (CD4+ CCR4- CXCR3+ CCR6-) was significantly lower and the proportion of Th2 cell (CD4+ CCR4+ CXCR3- CCR6-) higher in the group of deceased subjects compared to survivors ($p=0.0224$ and $p=0.0251$, respectively). The median Th1/Th2 ratio was of 9.4 for deceased patients whereas it was 38.7 in the group of survivors ($p=0.0078$). Despite the absence of difference in the total CD8 population, the proportion of effector CD8 was higher and the central memory CD8 (CM CD8) subset was lower in the deceased group ($p=0.0043$ and $p=0.0393$, respectively). In parallel to the reduced Th1 profile for CD4, the proportion of cytotoxic Tc1 CD8 cells were also lower among the non-survivors (36%) compared to the survivors (62.1%) ($p=0.0277$). Moreover, the Tc1 profile was reduced for all CD8 cell subpopulations (effector, effector memory and central memory CD8) of the non-survivors compared to survivors ($p=0.02$, $p=0.003$, $p=0.02$, respectively) (data not shown). Deceased patients thus had a higher proportion of effector CD8 T cells, but they were less cytotoxic than in the group of survivors. Finally, NK cells were significantly reduced in the group of non-survivors (median=31 cells/ μ L) compared to the group of survivors (median = 93 cells/ μ L) ($p=0.0251$). There was no significant difference in the population of B cells or NK T cells.

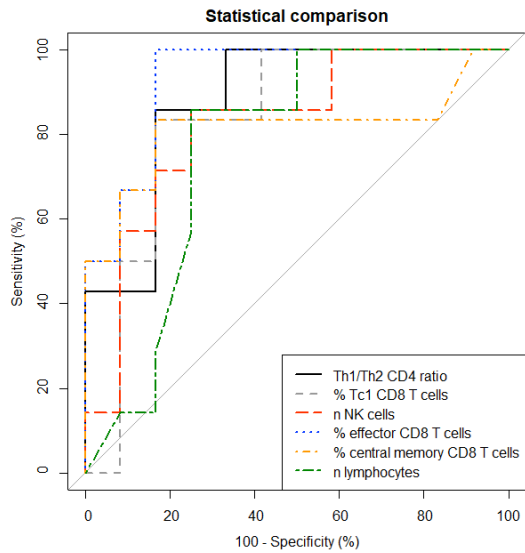
PCP (+)			
	Survivors	Deceased	p-value
n patients	12	7*	
Median age (years) [min; max]	64 [36; 78]	68 [30; 70]	0,7
Sex ratio (M/F)	1,4 (7/5)	6 (6/1)	0,33
Immunosuppression condition			
Solid organ transplant	3 (25%)	2 (29%)	1
Cancer with chemotherapy**	2 (17%)	4 (57%)	0,13
Bone marrow graft	2 (17%)	0 (0%)	0,51
Inflammatory disease	3 (25%)	0 (0%)	0,26
HIV-positive	2 (17%)	1 (14%)	1
Corticosteroid therapy	8 (67%)	6 (71%)	1
Fungal load (30-Cq)	7,5 [3,4; 9,9]	9,3 [4,7; 10,1]	0,53
Positive CMV PCR (blood and/or BAL)	2 (17%)	4 (57%)	0,13
Co-infections			
Bacteria	4 (33%)	6 (86%)	0,06
Viruses	6 (50%)	4 (57%)	1
Fungi	3 (25%)	3 (43%)	0,6
Clinical signs and hospital care			
Fever	11 (92%)	4 (57%)	0,12
Cough	9 (75%)	3 (43%)	0,33
Dyspnea	10 (83%)	7 (100%)	0,51
CT scan abnormalities	11 (92%)	7 (100%)	1
Intensive care admission	5 (42%)	5 (71%)	0,35
Mechanical ventilation/ High flow O2	5 (42%)	6 (86%)	0,15
Medians, [Interquartils intervals]			
n leukocytes (G/L)	5,7 [3,9; 12,1]	5,6 [2,9; 14,3]	0,97
n lymphocytes (G/L)	1,2 [0,7; 2,1]	0,6 [0,4; 0,7]	0,06
n neutrophils (G/L)	3,9 [2,3; 8,0]	4,2 [2; 12,4]	0,80
n eosinophils (G/L)	0,1 [0,0; 0,4]	0 [0,0; 0,1]	0,08
n basophils (G/L)	0 [0,0; 0,10]	0 [0,0; 0,10]	0,92
n monocytes (G/L)	0,5 [0,2; 1,1]	0,4 [0,1; 0,8]	0,27
n T CD3 (cells/μL)	784 [418; 1520]	500 [136; 538]	0,197
T CD3 (% lymphocytes)	66,7 [53,7; 80,8]	76,9 [48; 83,3]	0,707
n T CD4 (cells/μL)	405 [155; 880]	166 [89; 376]	0,167
T CD4 (% CD3)	63,6 [43,2; 82,4]	51,5 [42,5; 76,9]	0,90
Naives CD4 (%CD4)	19,1 [4,1; 46,6]	42,5 [24,9; 49,6]	0,14
Effectors CD4 (%CD4)	1,7 [0,7; 2,9]	2,9 [1,6; 5,7]	0,15
Effectors memory CD4 (%CD4)	28,2 [18,5; 65,4]	27,9 [19,0; 36,1]	0,47
Central memory CD4 (%CD4)	36,8 [23,2; 43,2]	28,6 [20,0; 39,9]	0,14
Th1 CD4 (%CD4)	20,6 [13,3; 30,6]	9,2 [7,0; 10,0]	<u>0,02</u>
Th2 CD4 (%CD4)	0,4 [0,3; 0,7]	1,3 [0,5; 1,5]	<u>0,03</u>
Th17 CD4 (%CD4)	0,5 [0,2; 0,8]	0,3 [0,1; 1,2]	0,83
Th1-Th17 CD4 (%CD4)	5,1 [3,2; 8,9]	3,9 [0,8; 9,2]	0,83
Th9 CD4 (%CD4)	8,4 [4,6; 12,1]	4,3 [2,1; 11,7]	0,33
CD4 Treg (%CD4)	4,9 [2,5; 7,9]	4,65 [3,0; 8,2]	0,97
Ratio Th1/Th2	38,7 [18,7; 110,4]	9,4 [4,3; 16,4]	<u><0,01</u>
Ratio Th17/Treg	0,08 [0,04; 0,15]	0,07 [0,02; 0,31]	0,83
n T CD8 (cells/μL)	161 [38; 604]	125 [58; 187]	0,53
T CD8 (% CD3)	29,9 [12,5; 47,7]	37,5 [16,3; 47,9]	0,97
Naives CD8 (%CD8)	16,6 [1,5; 34,3]	15,55 [12,3; 24,5]	0,81
Effector CD8 (%CD8)	17,9 [15,2; 24,4]	44,1 [28,6; 68,4]	<u><0,01</u>
Effector memory CD8 (%CD8)	50,3 [24,7; 76,2]	24,5 [15,4; 43,3]	0,15
Central memory CD8 (%CD8)	6,4 [5,3; 12,4]	2,3 [1,2; 7]	<u>0,04</u>
CD8 Treg (% CD8)	0,0 [0,0; 0,2]	0,1 [0,0; 0,2]	0,96
Non naive Tc1 CD8 (% CD8)	62,1 [45,1; 72,0]	36,0 [29,9; 45,5]	<u>0,03</u>
Non nave Tc2 CD8 (%CD8)	1,1 [0,9; 1,7]	1,2 [0,5; 2,4]	0,89
Non naive Tc9 CD8 (% CD8)	0,2 [0,1; 0,4]	0,3 [0,1; 0,5]	0,37
Ratio CD4/CD8	2,2 [0,9; 6,7]	1,4 [0,9; 4,7]	0,97
n B lymphocytes (cells/μL)	37 [4; 325]	25 [5; 55]	0,53
B lymphocytes (% lymphocytes)	4,7 [0,9; 20,0]	3,2 [0,9; 7,9]	0,64
n NK lymphocytes (cells/μL)	93 [48; 165]	31 [6; 45]	0,03
NK lymphocytes (% lymphocytes)	8,4 [4,5; 19,7]	4,5 [1,0; 7,1]	0,14
NK CXCR3+ (% NK)	9,8 [6,1; 24,5]	8,3 [6,4; 10,0]	0,47
n NK T lymphocytes (cells/μL)	34 [11; 83]	22 [8; 55]	0,7
NK T lymphocytes (% lymphocytes)	3,0 [1,2; 5,3]	3,3 [1,6; 9,1]	0,64
NK CD4 (% NK T)	15,8 [10,2; 24,8]	9,4 [3,3; 18,6]	0,18
NK CD8 (% NK T)	49,5 [25,4; 63,5]	41,0 [15,0; 71,2]	0,97

Table II: Comparison of clinical characteristics and lymphocyte populations in survivors and non-survivors of PCP(+) group.
*: 6 patients for CD8 subpopulations, **: contains hematological and solid cancers. Significant pvalues were underlined in the table.

Lymphocyte predictive values of PCP evolution

When comparing lymphocyte populations between deceased patients and survivors, there were significant differences in Th1 CD4, Th2 CD4, Th1/Th2 ratio, Tc1 CD8, effector CD8 and central memory CD8 proportions as well as in NK cell counts. From this observation, we wondered whether these populations could predict a high risk of mortality in patients affected with PCP. ROC curves evaluating sensitivity and specificity were then used to determine potential thresholds for Th1/Th2 ratio, the proportion of Tc1 CD8, effector CD8, CM CD8 and NK cells to predict mortality. Area under the curve (AUC) were 88.1% (95% IC[72.7%; 100%]), 83.33% (95% IC[63.9%; 100%]), 93.06% (95% IC[81.5%; 100%]), 81.25% (95%IC[54.9%; 100%]) and 82.14% (95% IC[62.4%; 100%]) for each parameter, respectively. There was no significant difference between AUC for these populations (Supplementary table SII). The best predictive values for a higher risk of mortality were Th1/Th2 <17, Tc1 CD8 proportion <44%, effector CD8 proportion >25% and NK cells <50 cells/ μ L. Considering those threshold, the negative predictive values (NPV) were higher than 90% for all parameters, with sensitivities around 85%, except for effector CD8 proportions with a 100% sensitivity. Positive predictive values (PPV) were all around 70% with specificities between 75% and 83% (Figure 2).

In order to confirm the potential predictive value of these lymphocyte populations in evaluating the risk of mortality, survival curves were done with a statistical comparison of the mortality of patients reclassified as over and below the previously fixed thresholds. Kaplan-Meier curves showed significant differences between patients below or over the thresholds for Th1/Th2, CD8 Tc1 proportion, effector CD8 proportion, central memory CD8 and NK cell counts with p-values of 0.003, 0.007, 0.0007, 0.004 and 0.02, respectively (Figure 3).



	Th1/Th2	% Tc1 CD8	% effector CD8	% CM CD8	n NK cells	n lymphocytes
Threshold	17	44%	25%	4%	50 cells/ μ L	0,75 G/L
Sensitivity (%)	85,7	83,3	100	83,3	85,7	85,7
Specificity (%)	83,3	83,3	83,3	83,3	75	75
PPV (%)	75	71,4	75	71,4	66,7	66,7
NPV (%)	90,9	90,9	100	90,9	90	90
AUC (%)	88,1	83,33	93,06	81,25	82,14	76,79

Figure 2: ROC curve analysis.
CM: central memory

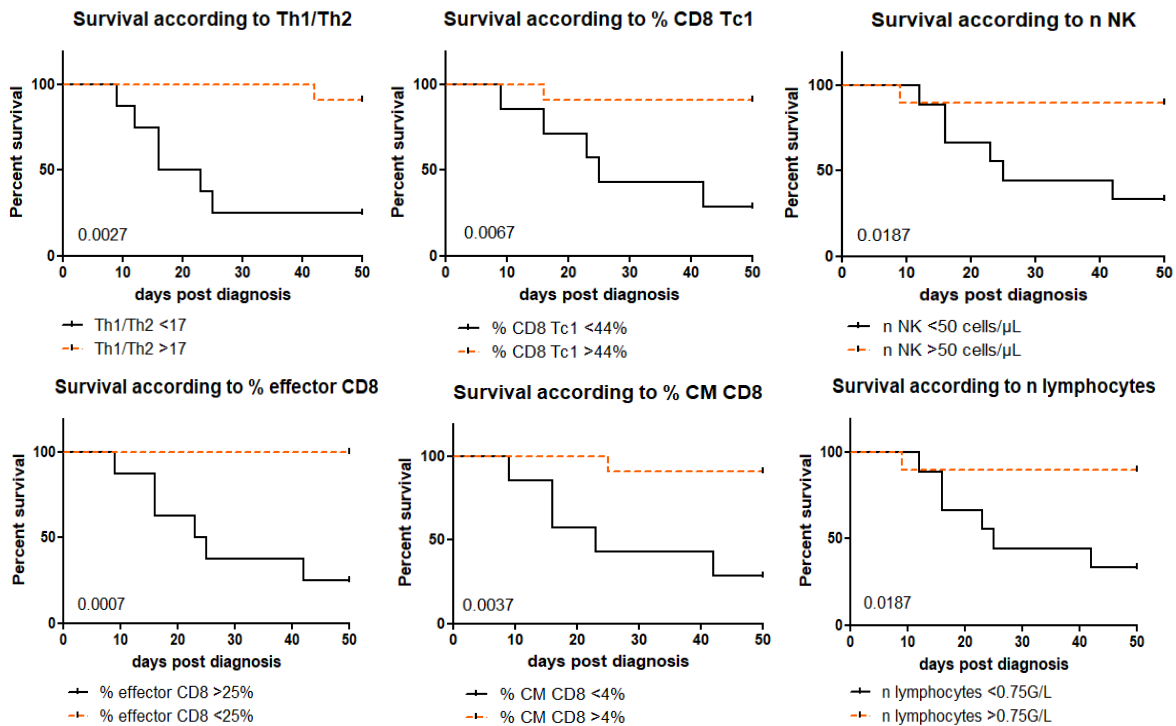


Figure 3: Survival Kaplan-Meier curves.
P values are added in the lower left corner of the graphs.

Furthermore, the total lymphocyte count was not significantly different between deceased and surviving subjects but there was a trend for reduced lymphocyte absolute values in the deceased group. Considering the ease to obtain this parameter in clinical practice in comparison to the five previous lymphocyte parameters, a ROC curve and a survival curve analysis were also performed for lymphocyte count. AUC for lymphocyte count by ROC analysis was 76.79% (95% IC[55%; 98.5%]), and was not significantly different from previous AUC for Th1/Th2, Tc1 or effector CD8 proportions or NK cell counts (Supplementary Table SII). The best threshold for total blood lymphocyte count was established at 0.75 G/L for which PPV and NPV were 66.7 and 90%, respectively (Figure 2). Kaplan-Meier analysis showed a significant difference below or over 0.75 G/L in the risk of mortality ($p=0.019$). We further tried to establish a connection between the total lymphocyte count threshold (0.75 G/L) and the lymphocyte subpopulations proportions that were significantly different between the deceased subjects and the survivors. Th1/Th2 ratio and Tc1 CD8 proportions were both reduced in patients for whom lymphocyte count was below 0.75G/L ($p=0.0076$ and $p=0.0266$ respectively). There was no significant difference in the proportion of effector CD8 T cells (Figure 4).

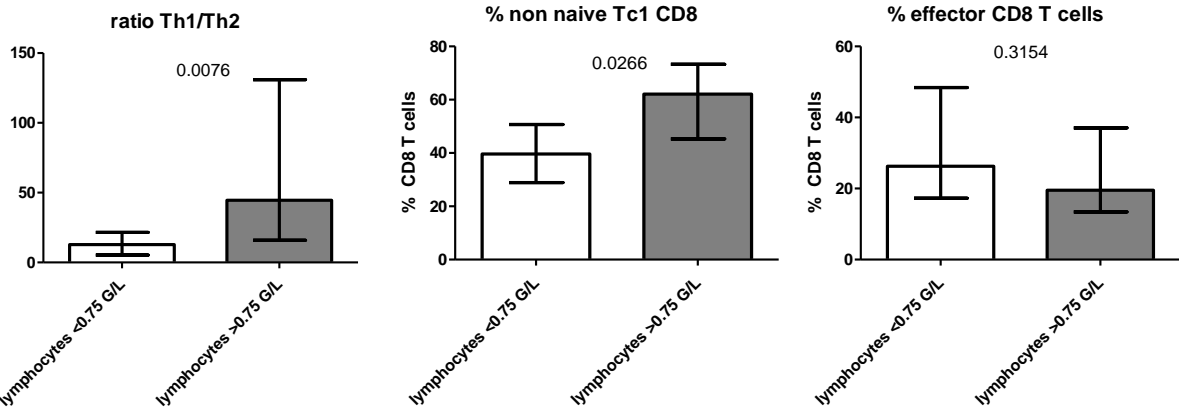


Figure 4: lymphocyte subpopulations according to total blood lymphocyte count threshold (0.75G/L). Data are expressed as the median [Interquartils intervals] and compared by Mann-Whitney test. P values are added on each graph.

DISCUSSION

Pneumocystis pneumonia is an opportunistic disease with eminent importance of the host inflammatory response. Immunocompetent hosts can eliminate the fungus without developing a disease while immunosuppressed patients cannot clear the fungus and develop an unsuitable pulmonary hyper-inflammatory response which is ultimately deleterious for the lungs. In our study, immunophenotyping was performed to compare lymphocyte populations and subpopulations between 19 PCP(+) and 20 PCP(-) patients, and also among PCP(+) subjects, between the 12 survivors and the 7 deceased patients.

The comparison of lymphocyte subpopulations between PCP(+) and PCP(-) patients showed no significant difference in CD4, CD8 and NK populations. A CD4 count <200 cells/ μ L is largely considered as a risk factor for PCP in HIV-positive patients (25) but this CD4 threshold is not as predictive for HIV-negative patients (3,7). Our study did not highlight any significant difference between PCP(+) and PCP(-) patients when considering this threshold. In a same manner, CD3 T cell counts were found to be decreased in HIV-negative patients affected with PCP compared to PCP-negative patients, among subjects with inflammatory or auto-immune diseases (26) whereas Zhang *et al*, as in our study, did not observe any difference in the circulating lymphocyte count between HIV-negative patients infected or not with PCP (27). The diversity of immunosuppression and its impact on the host defense against *Pneumocystis* could explain the absence of difference between the two groups. Other classically at risk parameters such as CMV reactivation or age (28) were not significantly different between the two groups in our study. In contrast, we did observe that a very low B cell count (<40 cells/ μ L) was more frequently associated to PCP(+) than to PCP(-) patients (63% vs 25%, respectively ; $p=0.04$). This reduction of B cell counts in patients affected with PCP had been already described among HIV-negative patients (29). The role of B cells in PCP has been scarcely evaluated until recently, the studies generally focusing on T cells. Some reports support the importance of B cells in PCP as mice depleted only with B cells develop PCP (17,30) while the use of anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab) targeting B cells is also considered as a risk factor for PCP in treated patients (15). Besides rituximab, corticosteroid therapy has been also shown to induce a reduction of B cell responsiveness *in vitro* and *in vivo* (31,32), also observed in the context of PCP in murine experiments (33). In our study, 14/19 (74%) of PCP(+) patients received corticosteroids [9/20 in PCP(-) group, $p=0.07$] and a high cumulative dose (>3000 mg of prednisone or equivalent in the 2 months preceding PCP) was associated with a higher risk of PCP. Nonetheless, no direct correlation could be made between B cell count and the dose of received corticosteroid, possibly due to the bias in the use of other immunosuppressive therapy such as rituximab or Hydrea. A reduction in B lymphocyte count could probably constitute a risk factor for PCP and thus, complement the CD4 T cell monitoring to assess the PCP risk, especially in HIV-negative patients.

In a second time, lymphocyte populations have been compared between survivors and deceased patients among PCP(+) group. In this study, deceased patients harbored a lower Th1 and Tc1 response, a higher Th2 profile associated with a higher proportion of effector CD8 T cells, a lower number of central memory TCD8 cells and a reduction of NK cell count. Th1 CD4 subset role in PCP is a controversial subject but a protective effect of this pro-inflammatory response has been previously shown in mice when adding IFN γ by aerosol or adenovirus to infected and immunosuppressed mice (8,34). It has also been observed in a recent clinical study that both CD4 Th1 and CD8 Tc1 proportions were negatively correlated with severity whereas CD8 Tc9 subset was positively correlated with severity (27). Murine experiments showed that the concentration of CD8 T cells in lung tissue increased greatly during PCP in, but their impact in the pathology is still discussed (35,36). Some studies found CD8 T cells have a role in the lung lesions during the hyperinflammatory state of PCP, with a reduced gas exchange due to a rupture of epithelial/endothelial cell integrity and albumin leakage (37). Other studies established that CD8 T cells could favor the fungal clearance in the absence of CD4 T cells (5) and that a low peripheral CD8 T cell count was associated with a bad evolution of PCP (26). In our study, survivors had a lower population of effector CD8 T cells and higher subpopulations of CM CD8 T cells than deceased patients with a protective Tc1 profile. As observed in others studies, some subsets of CD8 T cells could be deleterious to lung tissue whereas others could play a part in *Pneumocystis sp.* elimination such as highly polarized Tc1 CD8 subset or CM CD8 T cells (8,38). Ruan *et al.* also described a beneficial role of memory CD8 T cells, as their increase by addition of IL-7 in CD4-depleted infected mice leads to a better fungal elimination (39). The memory T cells are generally more rapidly and easily activated and are more efficient against their specific pathogen than non-memory-effector cells (40). Mc Allister *et al* showed that *Pneumocystis* lysis was increased when macrophages were in presence of CXCR3+ CD8 T cell (cytotoxic Tc1 CD8) compared to CXCR3- CD8 T cells (38).

The causes of the Th1/Tc1 response deficit or a reduced number of CM CD8 T cells observed in deceased patients was not determined in our study but it could be related to underlying diseases, therapeutics, specific viral or bacterial coinfections or to a *P. jirovecii* strain for instance. Further evaluations are needed to identify host or *Pneumocystis* parameters responsible for the difference of the CD4 and CD8 profiles.

NK cells were also lower in deceased patients. Few studies evaluated NK cells in the course of PCP but their specific depletion in *Pneumocystis*-infected mice lead to a higher fungal load suggesting their role during PCP (19). The reduction in NK cells could be associated with a lower Th1/Tc1 profile because of their capacity to produce IFN γ which stimulates the Th1/Tc1 pro-inflammatory response. Moreover, and the lower number of these antigen-presenting cells could result in less activation of immune-adaptative cells.

Contrarily to previous studies, we did not find any difference in the global lymphocyte population such as T lymphocytes, CD4 T, CD8 T or B cells between survivors and deceased PCP(+) patients (26,41,42). Nevertheless, there was a downward trend of total lymphocyte count in deceased patients. ROC curves and Kaplan Meier analysis made it possible to determine thresholds for lymphocyte count, Th1/Th2 ratio, Tc1 proportion, effector CD8 proportion or NK cells count to discriminate survivor and deceased patients. These criteria, especially the count of lymphocyte (threshold: 0.75 G/L) could be of interest for physicians in predicting outcome of PCP. Indeed, although it was not the parameter with the greater ROC AUC, the lymphocyte count is an easy biological parameter to obtain in clinical practice. All other parameters require lymphocyte immunophenotyping which is a specialized analysis, not available in most medical laboratories. Furthermore, the evaluation of lymphocyte subpopulations in patients with a total lymphocyte counts below the fixed 0.75 G/L threshold showed a reduction in Th1/Th2 ratio and Tc1 proportion, thus demonstrating a relationship of these parameters between survivors and deceased patients. The evaluation of the mortality risk could help physicians to adapt the patient care (administration route of drugs targeting *Pneumocystis*, oxygenotherapy, adjunction of corticosteroids) considering the potential severe evolution of the infection.

This study has several limitations among which the various immunosuppression conditions of the included PCP(+) cases, even if the PCP-negative patients were matched according the type of immunosuppression. The great diversity of included patients could explain the absence of differences in lymphocyte subsets. Nonetheless, it is interesting to observe significant differences in the apparent protective CD4 Th1 and CD8 Tc1 subsets despite such different immunosuppressive conditions. Finally, the disproportion of uninfected PCP(-) patients (5/20) who received a prophylactic regimen against *Pneumocystis* compared to the PCP(+) group (0/19) reminds that the cotrimoxazole prophylaxis is a protective factor against the disease and could have induced a bias in the lymphocyte comparison between the two groups.

In conclusion, this study showed that more PCP(+) patients had low peripheral B cell count (<40 cells/ μ L) compared to PCP(-) patients. The B cells are increasingly discussed in the context of PCP and could be of interest to evaluate the risk of PCP in immunosuppressed patients in addition to the CD4 T cells. This study also showed that host immune profiles with higher levels of CD4 Th1 and CD8 Tc1, a higher number of NK cells and a lower proportion of effector CD8 cells, are protective against PCP severity. Thresholds established for each subpopulation, as well as for lymphocyte count, could help predict a higher risk of mortality with relatively good NPV and PPV. More studies are required to understand the mechanisms modifying the Th1/Th2 ratio. Its potential orientation toward Th1/Tc1 could be a possible target to improve the evolution of patients with PCP.

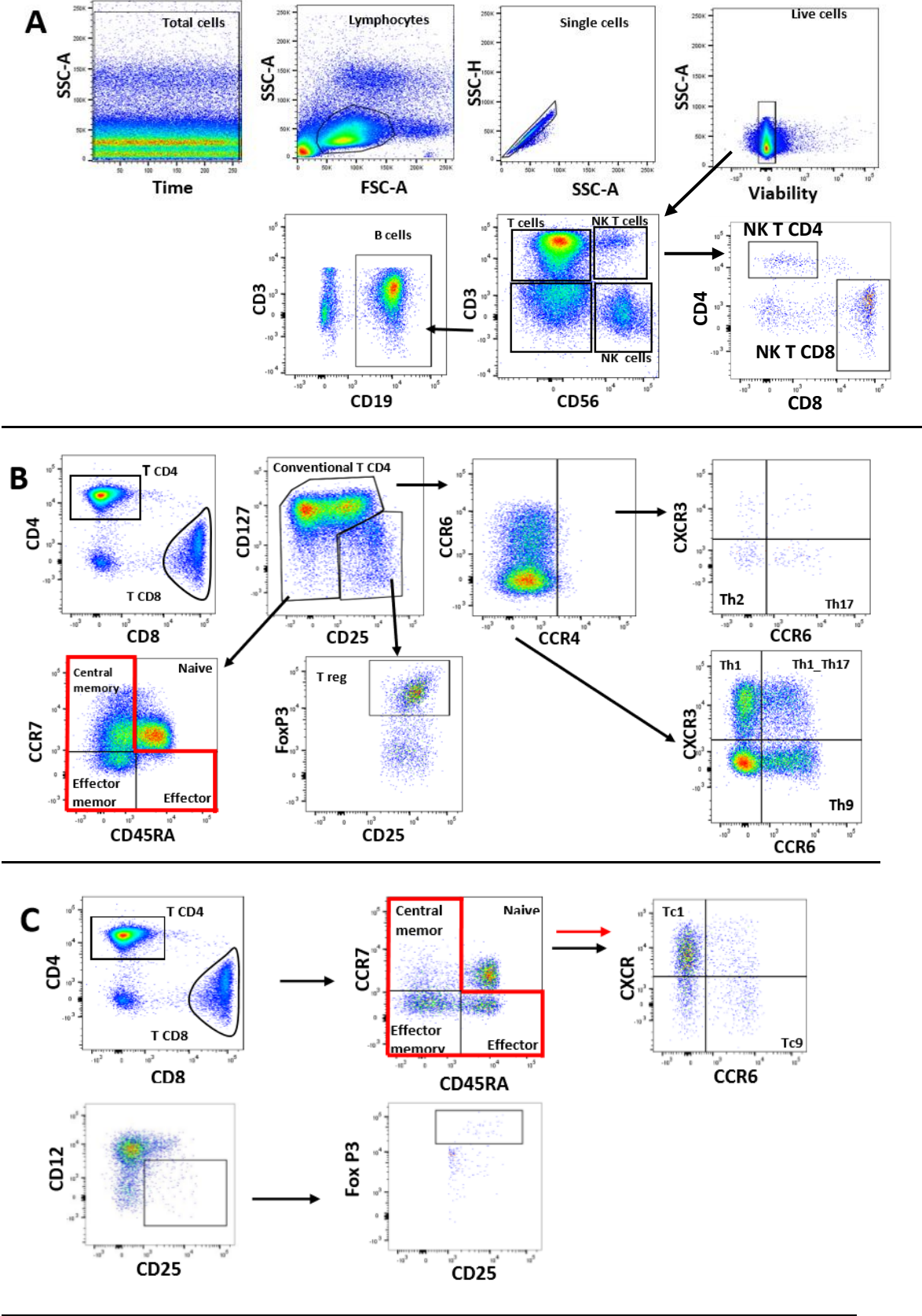
Aknowledgements : The authors gratefully acknowledge the cytometry technical platform of the Center for Pathophysiology Toulouse Purpan and especially Fatima L'Faqihi-Olive and Anne-Laure Iscache for their advice and technical support.

1. Roux A, Canet E, Valade S, Gangneux-Robert F, Hamane S, Lafabrie A, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with or without AIDS, France. *Emerging Infect Dis.* sept 2014;20(9):1490-7.
2. Wickramasekaran RN, Jewell MP, Sorvillo F, Kuo T. The changing trends and profile of pneumocystosis mortality in the United States, 1999-2014. *Mycoses.* 2017;60(9):607-15.
3. Enomoto T, Azuma A, Kohno A, Kaneko K, Saito H, Kametaka M, et al. Differences in the clinical characteristics of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromized patients with and without HIV infection. *Respirology.* janv 2010;15(1):126-31.
4. Centre de national de référence Mycoses Invasives et Antifongiques. Rapport annuel d'activité 2019 - Année d'exercice 2018 [Internet]. 2019 avr [cité 7 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/file/31034/download>
5. Wright TW, Gigliotti F, Finkelstein JN, McBride JT, An CL, Harmsen AG. Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Invest.* nov 1999;104(9):1307-17.
6. Limper AH, Offord KP, Smith TF, Martin WJ. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *Am Rev Respir Dis.* nov 1989;140(5):1204-9.
7. Iriart X, Witkowski B, Cassaing S, Abbes S, Menard S, Fillaux J, et al. Alveolar and blood T lymphocyte profiles in *Pneumocystis jirovecii*-positive patients: effects of HIV status. *J Infect Dis.* 15 août 2011;204(4):544-53.
8. Kolls JK, Habetz S, Shean MK, Vazquez C, Brown JA, Lei D, et al. IFN-gamma and CD8+ T cells restore host defenses against *Pneumocystis carinii* in mice depleted of CD4+ T cells. *J Immunol.* 1 mars 1999;162(5):2890-4.
9. Ruan S, McKinley L, Zheng M, Rudner X, D'Souza A, Kolls JK, et al. Interleukin-12 and host defense against murine *Pneumocystis pneumonia*. *Infect Immun.* mai 2008;76(5):2130-7.
10. Eddens T, Elsegeiny W, Nelson MP, Horne W, Campfield BT, Steele C, et al. Eosinophils Contribute to Early Clearance of *Pneumocystis murina* Infection. *J Immunol.* 1 juill 2015;195(1):185-93.
11. Ripamonti C, Bishop LR, Kovacs JA. Pulmonary Interleukin-17-Positive Lymphocytes Increase during *Pneumocystis murina* Infection but Are Not Required for Clearance of *Pneumocystis*. *Infect Immun.* 2017;85(7).
12. McKinley L, Logar AJ, McAllister F, Zheng M, Steele C, Kolls JK. Regulatory T cells dampen pulmonary inflammation and lung injury in an animal model of *Pneumocystis* pneumonia. *J Immunol.* 1 nov 2006;177(9):6215-26.
13. Hori S, Carvalho TL, Demengeot J. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur J Immunol.* 2002;32(5):1282-91.
14. Beck JM, Newbury RL, Palmer BE, Warnock ML, Byrd PK, Kaltreider HB. Role of CD8+ lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii* in mice. *J Lab Clin Med.* nov 1996;128(5):477-87.
15. Martin-Garrido I, Carmona EM, Specks U, Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia in patients treated with rituximab. *Chest.* juill 2013;144(1):258-65.

16. Alexandre K, Ingen-Housz-Oro S, Versini M, Sailer L, Benhamou Y. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients treated with rituximab for systemic diseases: Report of 11 cases and review of the literature. *Eur J Intern Med.* 2018;50:e23-4.
17. Swain SD, Meissner NN, Harmsen AG. CD8 T cells modulate CD4 T-cell and eosinophil-mediated pulmonary pathology in *Pneumocystis* pneumonia in B-cell-deficient mice. *Am J Pathol.* févr 2006;168(2):466-75.
18. Lund FE, Schuer K, Hollifield M, Randall TD, Garvy BA. Clearance of *Pneumocystis carinii* in mice is dependent on B cells but not on P carinii-specific antibody. *J Immunol.* 1 août 2003;171(3):1423-30.
19. Kelly MN, Zheng M, Ruan S, Kolls J, D'Souza A, Shellito JE. Memory CD4+ T cells are required for optimal NK cell effector functions against the opportunistic fungal pathogen *Pneumocystis murina*. *J Immunol.* 1 janv 2013;190(1):285-95.
20. Limper AH, Hoyte JS, Standing JE. The role of alveolar macrophages in *Pneumocystis carinii* degradation and clearance from the lung. *J Clin Invest.* 1 mai 1997;99(9):2110-7.
21. Lee JY, Park HJ, Kim YK, Yu S, Chong YP, Kim S-H, et al. Cellular profiles of bronchoalveolar lavage fluid and their prognostic significance for non-HIV-infected patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Clin Microbiol.* avr 2015;53(4):1310-6.
22. Fillaux J, Malvy S, Alvarez M, Fabre R, Cassaing S, Marchou B, et al. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Microbiol Methods.* oct 2008;75(2):258-61.
23. Décret n° 2017-884 du 9 mai 2017 modifiant certaines dispositions réglementaires relatives aux recherches impliquant la personne humaine. 2017-884 mai 9, 2017.
24. Robin X, Turck N, Hainard A, Tiberti N, Lisacek F, Sanchez J-C, et al. pROC: an open-source package for R and S+ to analyze and compare ROC curves. *BMC Bioinformatics.* 17 mars 2011;12(1):77.
25. Stansell JD, Osmond DH, Charlebois E, LaVange L, Wallace JM, Alexander BV, et al. Predictors of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* janv 1997;155(1):60-6.
26. Li Y, Ghannoum M, Deng C, Gao Y, Zhu H, Yu X, et al. *Pneumocystis* pneumonia in patients with inflammatory or autoimmune diseases: Usefulness of lymphocyte subtyping. *Int J Infect Dis.* avr 2017;57:108-15.
27. Zhang N-N, Huang X, Feng H-Y, Huang L-N, Xia J-G, Wang Y, et al. Circulating and Pulmonary T-cell Populations Driving the Immune Response in Non-HIV Immunocompromised Patients with *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Int J Med Sci.* 2019;16(9):1221-30.
28. Iriart X, Challan Belval T, Fillaux J, Esposito L, Lavergne R-A, Cardeau-Desangles I, et al. Risk factors of *Pneumocystis* pneumonia in solid organ recipients in the era of the common use of posttransplantation prophylaxis. *Am J Transplant.* janv 2015;15(1):190-9.
29. Rong H-M, Li T, Zhang C, Wang D, Hu Y, Zhai K, et al. IL-10-producing B cells regulate Th1/Th17-cell immune responses in *Pneumocystis* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 01 2019;316(1):L291-301.

30. Lund FE, Hollifield M, Schuer K, Lines JL, Randall TD, Garvy BA. B cells are required for generation of protective effector and memory CD4 cells in response to *Pneumocystis* lung infection. *J Immunol.* 15 mai 2006;176(10):6147-54.
31. Saxon A, Stevens RH, Ramer SJ, Clements PJ, Yu DT. Glucocorticoids administered in vivo inhibit human suppressor T lymphocyte function and diminish B lymphocyte responsiveness in in vitro immunoglobulin synthesis. *J Clin Invest.* avr 1978;61(4):922-30.
32. Cupps TR, Gerrard TL, Falkoff RJ, Whalen G, Fauci AS. Effects of in vitro corticosteroids on B cell activation, proliferation, and differentiation. *J Clin Invest.* févr 1985;75(2):754-61.
33. Hu Y, Wang D, Zhai K, Tong Z. Transcriptomic Analysis Reveals Significant B Lymphocyte Suppression in Corticosteroid-Treated Hosts with *Pneumocystis* Pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017;56(3):322-31.
34. Beck JM, Liggitt HD, Brunette EN, Fuchs HJ, Shellito JE, Debs RJ. Reduction in intensity of *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice by aerosol administration of gamma interferon. *Infect Immun.* nov 1991;59(11):3859-62.
35. Beck JM, Warnock ML, Curtis JL, Sniezek MJ, Arraj-Peffer SM, Kaltreider HB, et al. Inflammatory responses to *Pneumocystis carinii* in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* août 1991;5(2):186-97.
36. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev.* avr 2012;25(2):297-317.
37. Meissner NN, Lund FE, Han S, Harmsen A. CD8 T cell-mediated lung damage in response to the extracellular pathogen *Pneumocystis* is dependent on MHC class I expression by radiation-resistant lung cells. *J Immunol.* 15 déc 2005;175(12):8271-9.
38. McAllister F, Mc Allister F, Steele C, Zheng M, Young E, Shellito JE, et al. T cytotoxic-1 CD8+ T cells are effector cells against *Pneumocystis* in mice. *J Immunol.* 15 janv 2004;172(2):1132-8.
39. Ruan S, Samuelson DR, Assouline B, Morre M, Shellito JE. Treatment with Interleukin-7 Restores Host Defense against *Pneumocystis* in CD4+ T-Lymphocyte-Depleted Mice. *Infect Immun.* 2016;84(1):108-19.
40. Berard M, Tough DF. Qualitative differences between naïve and memory T cells. *Immunology.* juin 2002;106(2):127-38.
41. Liu Y, Zheng K, Liu Y, Zhu H. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in Patients with Nephrotic Syndrome: Application of Lymphocyte Subset Analysis in Predicting Clinical Outcomes. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2020;2020:4631297.
42. Freiwald T, Büttner S, Cheru NT, Avaniadi D, Martin SS, Stephan C, et al. CD4+ T cell lymphopenia predicts mortality from *Pneumocystis* pneumonia in kidney transplant patients. *Clin Transplant.* 11 avr 2020;e13877.

SUPPLEMENTARY DATA



Supplementary Figure S1: Gating strategy for lymphocyte immunophenotyping. A: general lymphocyte immunophenotyping. B: CD4 subpopulation gating from T cells determined in gating strategy A. C: CD8 subpopulation gating from T cells determined in gating strategy A.

	Control	PCP (+)	PCP (-)	p-value*	p value** Control vs PCP (+)	p value** Control vs PCP (-)	p value** PCP (+) vs PCP (-)
T lymphocytes (% lymphocytes)	67,0 [52,4; 81,9]	67,0 [52,4; 81,9]	66,0 [40,4; 82,9]	0,73			
T CD4 (% CD3)	74,7 [67,0; 82,0]	58,6 [42,5; 76,9]	73,5 [55,8; 86,3]	0,21			
Naives CD4 (%CD4)	40,5 [27,5; 51,3]	24,9 [7,5; 49,6]	23,2 [4,2; 62,7]	0,31			
Effectors CD4 (%CD4)	2,9 [1,7; 5,4]	2,0 [1,1; 4,3]	2,2 [1,2; 4,2]	0,41			
Effectors memory CD4 (%CD4)	19,9 [13,7; 34,1]	27,9 [19,0; 50,7]	35,2 [14,1; 52,1]	0,21			
Central memory CD4 (%CD4)	33,9 [27,4; 41,8]	30,5 [22,3; 42,2]	30,6 [23,5; 39,9]	0,21			
Th1 CD4 (%CD4)	15,6 [10,9; 20,2]	12,6 [7,2; 29,1]	13,2 [8,9; 21,5]	0,71			
Th2 CD4 (%CD4)	0,3 [0,2; 0,4]	0,6 [0,3; 1,2]	0,4 [0,2; 1,0]	<u>0,02</u>	<0,05	NS	NS
Th17 CD4 (%CD4)	0,2 [0,1; 0,3]	0,4 [0,2; 0,8]	0,3 [0,1; 0,5]	<u>0,02</u>	<0,05	NS	NS
Th1-Th17 CD4 (%CD4)	8,5 [5,0; 11,6]	4,5 [1,6; 9,1]	5,3 [2,4; 9,4]	0,07			
Th9 CD4 (%CD4)	7,8 [6,0; 10,4]	5,5 [4,0; 11,7]	7,4 [2,8; 14,6]	0,63			
CD4 Treg (%CD4)	5,4 [5,0; 6,2]	4,7 [2,9; 8,2]	4,3 [3,9; 7,9]	<u><0,01</u>	<0,01	<0,05	NS
Ratio Th1/Th2	52,9 [29,5; 138,7]	20,3 [9,2; 45,0]	29,5 [13,2; 49,1]	0,55			
T CD8 (% CD3)	17,9 [10,9; 24,4]	34,3 [15,6; 47,8]	17,1 [8,8; 25,9]	0,09			
Naives CD8 (%CD8)	19,2 [9,3; 30,8]	13,7 [4,0; 33,6]	19,3 [7,0; 33,4]	0,68			
Effectors CD8 (%CD8)	27,1 [18,1; 35,3]	21,3 [16,2; 38,2]	30,8 [14,3; 48,4]	0,76			
Effectors memory CD8 (%CD8)	41,6 [34,4; 49,9]	42,4 [16,9; 73,8]	36,6 [25,9; 48,9]	0,69			
Central memory CD8 (%CD8)	8,2 [4,9; 14,1]	6,1 [2,5; 11,2]	6,0 [2,9; 8,1]	0,08			
FoxP3+ CD8 (% CD8)	0,3 [0,11; 0,48]	0,1 [0,00; 0,2]	0,1 [0,0; 0,4]	<u><0,01</u>	<0,01	NS	NS
Non naive Tc1 CD8 (% CD8)	57,5 [49,6; 67,0]	45,5 [35,3; 70,8]	49,7 [34,7; 61,3]	0,23			
Non naive Tc9 CD8 (% CD8)	0,6 [0,4; 1,5]	0,2 [0,1; 0,4]	0,3 [0,1; 0,7]	<u><0,001</u>	<0,001	<0,05	NS
Non naive Tc2 CD8 (% CD8)	0,8 [0,5; 1,2]	1,1 [0,8; 2,0]	1,5 [1,0; 2,0]	<u>0,01</u>	NS	<0,01	NS
Ratio CD4/CD8	4,0 [2,8; 7,6]	1,7 [0,9; 4,7]	4,6 [2,0; 9,7]	0,11			
B lymphocytes (% lymphocytes)	12,3 [7,8; 14,5]	4,0 [0,9; 17,4]	12,5 [2,6; 21,4]	0,12			
NK lymphocytes (% lymphocytes)	10,2 [7,5; 15,6]	11,7 [7,0; 34,6]	3,4 [1,6; 9,2]	<u><0,01</u>	NS	<0,01	NS
NK CXCR3+ (% NK)	8,0 [5,4; 13,1]	8,3 [6,4; 15,5]	9,9 [7,1; 18,8]	0,32			
NK T lymphocytes (% lymphocytes)	4,5 [2,5; 7,4]	3,2 [1,4; 5,3]	2,1 [0,9; 7,8]	0,14			
NK CD4 (% NK T)	6,8 [4,2; 17,1]	11,8 [6,1; 20,7]	15,2 [3,0; 31,0]	0,49			
NK CD8 (% NK T)	63,3 [49,0; 73,6]	46,3 [24,5; 64,5]	45,2 [34,8; 53,4]	<u>0,02</u>	NS	<0,05	NS

Supplementary table SII: comparison in the proportions of lymphocyte subpopulations between control healthy subjects and immunosuppressed PCP(+) or PCP(-) patients.

*: Kruskal Wallis's test, **: Dunn's test performed when ANOVA test showed a significant difference.

		Th1/Th2	% Tc1 CD8	n NK cells	% effector CD8	% CM CD8	n lymphocytes
	AUC	88.1%	83.33%	82.14%	93.06%	81,25%	76.79%
Th1/Th2	88.1%	-	p=0.34	p=0.65	p=0,56 [#]	p=0,80	p=0.36
% Tc1 CD8	83.33%		-	p=0.86	p=0,44 [#]	p=0,90	p=0.63
n NK cells	82.14%			-	p=0,32 [#]	p=0,91	p=0,61
% effector CD8	93.06%				-	p=0,37 [#]	p=0,19 [#]
% central memory CD8	81,25%					-	p=0,70
n lymphocytes	76.79%						-

Supplementary table SII: comparison of the area under the curve (AUC) for the ROC analysis.

AUC: Area under the curve. #: comparison performed with Bootstrap test. There was no significant difference between the AUC ($p > 0.05$).

Conclusion et perspectives de l'article 1

Cette première étude chez l'Homme, a mis en évidence un potentiel intérêt des lymphocytes B en tant que facteur de risque de PCP et un effet bénéfique des populations CD4 Th1, CD8 Tc1 et des cellules NK sur la mortalité, une fois la maladie développée. A l'inverse, une haute proportion des cellules CD4 Th2 et CD8 effectrices a été associée avec un moins bon pronostic.

Bien que les études cliniques soient essentielles à la compréhension de la PCP, les modèles animaux de PCP permettent d'obtenir des informations nécessitant des procédures plus invasives. D'autre part, les modèles murins de PCP sont pertinents puisqu'ils reflètent fidèlement la pathologie observée chez l'Homme. Les résultats de la première étude clinique présentée dans cette thèse sont ainsi tout à fait cohérents avec des travaux précédents menés chez la souris, au cours desquels une augmentation de la réponse Th1 par administration d'IFN γ ou d'IL-12 aboutissait à une diminution de la charge fongique (259–261).

Ainsi, afin de poursuivre nos investigations sur la PCP, nous avons souhaité, pour la suite de ce travail, mettre en place et travailler sur un modèle murin de la maladie, pour explorer plus largement le processus inflammatoire et pouvoir être plus interventionnel. Le processus inflammatoire est une réponse impliquant de multiples éléments de nature cellulaire, lipidique et protéique. Si l'étude des leucocytes, en particulier des lymphocytes, a fait l'objet de nombreux travaux, peu d'études se sont concentrées sur la réponse lipidique. Pourtant, les médiateurs lipidiques de l'inflammation ont un rôle majeur lors de l'initiation et de la résolution de l'inflammation. Ils regroupent en effet les eicosanoïdes pro-inflammatoires, dont les prostaglandines, mais aussi les lipides pro-résolutifs de l'inflammation (SPM), indispensables pour le retour d'un état inflammatoire vers un état d'homéostasie (148). Compte tenu de l'inflammation excessive qui se développe au cours de la PCP, on peut imaginer que ces composés SPM aient également un impact sur le développement de la maladie.

A la différence de la majorité des études menées sur modèle murin de PCP, où l'immunosuppression est obtenue par une déplétion en T CD4 ou des lymphocytes totaux, nous avons opté pour un modèle d'immunodépression médiée par corticoïdes. L'utilisation d'anticorps anti-CD4 était adaptée à l'épidémiologie de la PCP des années 1990s, largement liée à l'épidémie du VIH. A l'heure actuelle, l'épidémiologie de la PCP implique majoritairement des sujets non infectés par le VIH (80%) très fréquemment traités par corticoïdes (3). L'utilisation de corticothérapie pour ce modèle semble ainsi plus proche de la réalité épidémiologique actuelle et paraît être plus pertinente (67,68).

En considérant la complexité des échanges entre composants de l'inflammation, l'article suivant avait pour objectif de décrire en parallèle, les réponses cellulaires, lipidiques et protéiques qui se

développent chez des souris infectées par *P. murina*, en conditions physiologiques (souris immunocompétentes) et pathologiques (souris immunodéprimées par corticothérapie).

Article 2 : Différentes réponses inflammatoires à une infection par *Pneumocystis murina* en fonction du statut immunitaire de l'hôte : implication des cellules immunes, des lipides pro-inflammatoires et anti-inflammatoires.

Distinct Inflammatory responses to *Pneumocystis murina* infection according to the host immune status: implication of immune cells, pro-inflammatory and pro-resolving lipid profile

Eléna Charpentier^{1, 2}, Sandie Menard², Catherine Marques², Vincent Baillif³, Marc Dubourdeau³, Antoine Berry^{1, 2}, Nicolas Blanchard², X. Iriart^{1, 2}

¹: Department of Parasitology-Mycolology, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

²: Center for Pathophysiology Toulouse Purpan (CPTP), Inserm, CNRS, University of Toulouse III, UPS, Toulouse, France

³: Ambiotis SAS, Toulouse, France

ABSTRACT:

Inflammation is a complex natural process that aims to defend the host against endogenous or exogenous « danger » signals and that involves numerous components of cellular, lipid and protein nature. Yet, it can be deleterious for the organism if it becomes excessive, as in *Pneumocystis pneumonia* (PCP). Immune cells, and mostly lymphocytes, have been largely studied in PCP but without a clear understanding of the different subpopulations' role in the disease. Lipid mediators (LM) that are implicated in both initiation and resolution of the inflammation have been poorly investigated in PCP. This study aimed to evaluate, in parallel, the cellular, lipid and protein responses that develop in immunocompetent or immunosuppressed *Pneumocystis*-infected mice.

In immunocompetent mice, there was a strong infiltration of B cells that were organized in structure adjacent to a bronchus containing also T cells and macrophages. This tertiary lymphoid structure evoked an induced Bronchus-Associated Lymphoid Tissue, known to contain CD4 T follicular helper (Tfh) cells.

In immunosuppressed mice, there was a delayed CD4 T cells activation with a rather Th2 oriented profile and a very strong CD8 Tc1 T response. A higher Th1/Th2 ratio would be related to a better evolution of the disease.

Pro-resolving lipids (SPM) were poorly produced in immunocompetent mice but were strongly increased in immunosuppressed mice. A high concentration of prostaglandin E2 (PGE2) that favors a Th2 response and triggers the SPM synthesis was associated with an unfavorable evolution of the disease. An omega 3-enriched diet was associated with higher SPM plasma concentration but without improvement of PCP. Conversely, an omega 6-enriched diet reduced PGE2 and some SPM concentrations, with an improved *Pneumocystis* clearance and respiratory symptoms.

In conclusion, according to the infected host immune status, both lymphocyte and lipid mediators could have different impact on the disease. B cells and Tfh cells would be protective in case of immunocompetency while Th1 response with reduced SPM and PGE2 would improve PCP evolution in immunosuppressed hosts.

INTRODUCTION

Pneumocystis pneumonia (PCP) is a severe opportunistic fungal disease that remains a threat for patients with AIDS or other immunosuppressive condition (1). The pulmonary lesions and respiratory symptoms encountered during the disease have been associated with an exaggerated and inadequate inflammation response from the infected host rather than a direct cytopathogenic effect of the fungus itself (2,3). While immunocompetent infected host can eliminate the fungus without any symptoms, immunosuppressed infected hosts develop an important but inefficient inflammatory response that is unable to clear the fungus.

Lymphocytes and particularly T lymphocytes have been mainly implicated both in the fungal clearance and in the toxic unadapted host response development, as it has been extensively described in recent reviews (4,5). Although CD4 T cells have been abundantly studied and are recognized as key immune cells during PCP, the specific subpopulations that are actually beneficial for *Pneumocystis* elimination or, at the opposite, that are deleterious for the lungs, is still a controversial subject. Indeed, some studies show an improvement of *Pneumocystis* elimination with Th1 increase (6,7) whereas other find this Th1 answer toxic for the lungs (8). Others find a beneficial effect of Th2 profile (9). CD8 T cells also are implicated in the PCP pathophysiology, mostly in the absence of CD4 T cells (10). Despite being less studied than T lymphocytes, B lymphocytes' interest in PCP is currently growing with the evidence that their depletion is sufficient to trigger a susceptibility to PCP (11).

Other elements of the inflammatory response are lipid mediators (LM) among which the pro-inflammatory eicosanoids such as prostaglandin and thromboxan. LM have been poorly studied during PCP until now. Yet, their role in the inflammation initiation and leukocyte recruitment is fundamental (12). Eicosanoid metabolism also switches during the inflammation process to produce proresolving lipid mediators (SPM) that are of the utmost importance to control the inflammation. Indeed, for some decades now, the inflammation resolution is believed to be an active process. The inflammatory process would require the activity of pro-resolving lipid mediators (SPM) that includes the lipoxins, resolvins, protectins and maresins lipid molecules (13). These LM have different functions among which polymorphonuclear neutrophils (PMN) migration reduction, apoptotic cells phagocytosis stimulation and macrophages phagocytosis enhancement (14). The combined actions of these SPM and the elimination of the original « danger » stimuli allow the progressive end of the inflammation process, hence the return to homeostasis (15). SPMs have been shown to improve the evolution of inflammatory infectious diseases such as the flu or malaria (16). To the best of our knowledge, SPMs have not yet been evaluated in the context of PCP. One can hypothesize that the respiratory lesions

connected to an uncontrolled inflammation could be related to a default in the SPM production, hence in the inflammation resolution.

In order to better understand the inflammatory process happening during PCP, we performed a study on a murine model of PCP using *Pneumocystis murina* strain. This study evaluated globally lymphocyte response and LM both in immunocompetent *Pneumocystis*-infected mice able to clear the fungus and in immunosuppressed mice that develop the disease. Considering the novelty of the lipid mediators evaluation in PCP, the evaluation was further done by modifying the uptake of the LM precursors, that is to say omega 3 (w3) and omega 6 (w6) fatty acids (FA), in immunosuppressed infected mice.

MATERIEL AND METHODS

Ethics statement

Animal care and use protocols were carried out under the control of the National Veterinary Services and in accordance with the European regulations (EEC Council Directive, 2010/63/EU, September 2010). Protocols inducing pain were approved under code APAFIS #18339, by the local ethical committee for animal experimentation (Ethics Committees on animal testing, CEEA 122 of US006/CREFRE) affiliated with the national Ethics Committees on animal testing.

Mice

6-week-old female SCID CB17 were purchased from Janvier Labs and female Balb/c AnNC mice aged 4 to 7 weeks were obtained from Charles River breeding laboratories. All animals were housed and bred under specific-pathogen-free conditions at the animal care facility of the "Centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et de Ressources Expérimentales" (CREFRE-Inserm UMS006). The mice were housed in filtered-topped cages and were provided water and chow *ad libitum* with a daily surveillance. All physical handling started at least one week after the mice arrival so that the mice could accommodate to the animal care facility conditions. Mice were handled under a laminar flow hood to maintain sterile conditions throughout the course of the experiment. The number of mice and experimental replicates are indicated in the respective figure legends.

***Pneumocystis murina* strain**

P. murina cysts were kind gifts from the Institut Pasteur Lille. Strains were propagated in SCID CB17 mice treated with corticosteroids (dexamethasone added in water at 2 mg/L concentration) as

previously described (17). Briefly, lungs of infected SCID mice were harvested 7 weeks after infection. The lungs were crushed, homogenized in DMEM, purified by filtering twice with a 65- μ m porosity. Cysts present in the lung homogenate were then quantified microscopically after a blue toluidine staining. After a 10-minute centrifugation at 2900g, the pellet was resuspended in FBS + DMSO 10% to produce aliquots, each containing 50×10^6 cysts of *P. murina*. *Pneumocystis*-free crushed lungs from uninfected SCID mice treated with dexamethasone (2 mg/L) were also prepared in the same manner to inoculate uninfected control mice. All aliquots were cryopreserved in liquid nitrogen until the day of inoculation.

Immunosuppression

To induce immunosuppression, Balb/c mice were treated with dexamethasone (Merck) in their drinking water at a concentration of 4 mg/L. The corticosteroids (CTC) therapy started one week before the *P. murina* inoculation and lasted throughout the whole experiment. Immunosuppressed mice also received tetracycline (0.5 g/L) (Sigma) in their drinking water in order to avoid other unwanted infection (17).

Study design

In order to evaluate the inflammation response in case of *P. murina* infection in immunocompetent or immunosuppressed mice, 4 groups were used: infected and immunosuppressed [Pm(+) CTC(+)], uninfected and immunosuppressed mice [Pm(-) CTC(+)], infected and immunocompetent mice [Pm(+) CTC(-)], and uninfected and immunocompetent (naive) mice [Pm(-) CTC(-)].

Corticosteroids are necessary to induce immunosuppressive conditions compatible with PCP development in mice. Nevertheless, corticosteroids had a direct impact on some SPM and cytokine concentrations but also on lymphocyte immunophenotyping. As we wanted to study specifically the response to *Pneumocystis* infection, all the results of SPM, cytokines and lymphocytes populations were expressed as a ratio of infected mice to uninfected mice [Pm(+) CTC(+)/Pm(-) CTC(+)] and Pm(+) CTC(-)/Pm(-) CTC(-)].

To evaluate the nutritional contribution on the inflammation during *Pneumocystis* pneumonia, two other groups of *P. murina*-infected and immunosuppressed mice received modified diets, either enriched in omega 3 [Pm(+) CTC(+) w3] or omega 6 [Pm(+) CTC(+) w6] fatty acids. The administration of modified diets started 4 weeks before the infection i.e. 3 weeks before the immunosuppression when the mice were 4 weeks old, and was maintained throughout the duration of the whole experiment.

Mice were then sacrificed at 3 milestones (1, 3 and 6 weeks post-infection) to analyze the lipid mediator (LM) profiles and the fungal load in the lungs, the lymphocyte subpopulations in the spleen and the lungs and the cytokine profiles in the plasma. Lungs were also harvested for histopathology and immunohistochemistry.

Lipid-enriched diets

The mice from the 4 groups [Pm(+) CTC(+)], [Pm(+) CTC(-)], [Pm(-) CTC(+)] and [Pm(-) CTC(-)] received a classical diet whose composition is detailed in supplementary data (Figure S1). The mice in the group “Pm(+) CTC(+) w3” received a diet enriched in w3 FA that contained 1% of EPA and DHA FA, added to the classical diet. Mice in the group “Pm(+) CTC(+) w6” received a diet enriched in omega 6 FA that were supplemented with 1% of corn oil compared to the classical diet. Corn oil is rich in omega 6 FA and contains very few w3 FA. All the diets were purchased to Ssniff-Spezialdiäten GmbH (Soest, Germany). In order to avoid oxidation of the unsaturated FA, chows were stored in small packages at –20°C with additional oxygen absorber. Moreover, chow food was entirely renewed twice a week.

Clinical evaluation

During the experiments, all mice were monitored twice a week with a systematic weigh-in, an evaluation of the fur and the mobility. In order to evaluate more specifically the lung functions, the respiratory rate was determined before each kinetic point. Mice were immobilized by simple restraint and were recorded for a 20-seconds-period. The videos were then observed at slow-motion to enable the counting of respiratory movements and respiratory rate was finally report as breath by minute.

Histopathology and Immunohistochemistry

After the sacrifice of mice, the whole lung-heart block was removed from the thoracic cage after the lungs were instilled intratracheally with 600µL of formalin to ensure the tissue structure was preserved. Tissues were then plunged in formalin for 24 hours at room temperature and transferred into a jar full of 70% ethanol for a storage at 4°C. After paraffin embedding, lungs were cut into 5 µm thick sections with a Leica RM2245 microtome (Leica, Wetzlar, Germany). Sections were stained with hematoxylin-eosin (HE) for the assessment of histological lesions and Gomori-grocott for fungal detection. Immunohistochemistry was also performed using rabbit anti-CD3, rat anti-B220, rat anti-Ly6G and rat anti-F480 labeled with diaminobenzidine (DAB) for the staining of T lymphocytes, B lymphocytes, polymorphonuclear neutrophils (PMN) and macrophages, respectively. All sections were then scanned with Panoramic 250 Flash III slide scanner (3D Histech, Belgrade, Hungary) at an x400 magnification.

Lymphocyte phenotyping

Mice were euthanized and the lungs were collected in RPMI (Gibco) supplemented with 10% (vol/vol) fetal bovine serum (FBS). The four lobes of the right lung were minced into small pieces with a scalpel in FBS-free RPMI, digested with FBS-free RPMI supplemented with DNase 1X (Sigma-Aldrich) and collagenase 1X (Roche) for 30 minutes at 37°C and mashed through a 100µm cell strainer. Lung cells were washed in complete RPMI, suspended in 30% Percoll and layered on a 60% Percoll. After a 20-minute centrifugation at 1600g, the mononuclear cells were collected from the interface. Erythrocytes were lysed using Ammonium Chloride Potassium buffer (EDTA 100µmol/L, 160nmol/L NH₄Cl, 10 mmol/L NaHCO₃).

A panel of 10 antibodies was used with a prior ex-vivo T cell stimulation. It included the following antibodies : CD4-BV510 (BD biosciences, San Jose, California), CD44-FITC (BD biosciences), CD8a-APC (Ebioscience, San Diego, California), CD3-AF700 (BD biosciences), granzyme B-PE (Ebioscience), IFNγ-BV786 (BD biosciences), IL-10-PerCP-Cy5.5 (Ebioscience), IL-13-PE-Cy7 (Ebioscience), IL-17A (Bbiologend, San Diego, California) and a viability dye-eFluor450 (Ebioscience). A second panel, that did not require a prior ex-vivo T cell stimulation, contained 6 antibodies : CD3-BV421 (BD biosciences), CD4-AF700 (BD biosciences), CD8a-APC (Ebiosciences), FOXP3-PE (Ebioscience), CD56-BV510 (BD biosciences) (and viability die-eFluor 480 (Ebioscience).

A total of 10⁶ lung cells were incubated for 4 hours at 37°C with phorbol myristate acetate (PMA) at 0.5 µg/mL and ionomycin (2µg/mL), for a TCR-independent stimulation. Brefeldin A (BFA) 0.1% was added to block the cytokine secretion and allow the further study of cytokine expression.

The cell staining was performed in three steps. After Fc receptor saturation (FcR block, anti-CD16 anti-CD32, Biolegend), cells were firstly stained with the viability dye. In a second time, the cells were labeled with the extracellular antibodies. Intracellular stainings were performed after a cell fixation followed by a cell permeabilization with FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set (Ebioscience). Cells were finally fixed with paraformaldehyde (PFA) 1% before the flow cytometry acquisition. Cytometry acquisitions were performed the following day using LSR-Fortessa flow cytometer (BD Biosciences) and data were analyzed using Flowjo software (version 10). The gating strategies are detailed in supplementary data (Figure S2).

Lipid mediators (LM) measurements

Immediately after lung harvesting, the remaining left lung unused for cytometry analysis was frozen at -80°C to prevent further LM degradation. Before the analysis, lungs were crushed with MagNA Lysor Green Beads (Roche) in a methanol/water (1:1 vol/vol) buffer (both respecting the purity standard for

HPLC analysis). The extraction protocol and analysis of bioactive lipids were performed as described in Le Faouder, Baillif *et al* (18) and adapted by the Ambiotis SAS (Toulouse, France) standard operating procedures. Samples were taken to solid phase extraction in the presence of deuterated internal standards, and lipid mediators (LM) were eluted in MeOH. After solvent evaporation, samples were dissolved in MeOH/H₂O and injected into an Exion-LCAD U-HPLC system (Sciex) equipped with a Kinetex C18 column (2.1 mm*100 mm, 1.8 μm) (Phenomenex). LM were eluted with a binary gradient of water/formic acid 0.1% and MeOH/formic acid 0.1% and taken to MS/MS analysis on a Q-TRAP 6500+ instrument (Sciex). LM were identified based on matching of retention time to authentic standards. Calibration curves were obtained using authentic LM mixtures, and quantification was carried out based on peak areas from multiple reaction monitoring (MRM) transitions (18). The following LM were measured : 6-keto-prostaglandinF1 (6K-PGF1), Thromboxane B2 (TXB2), prostaglandine E2 (PGE2), Lipoxin B4 (LXB4), 15-Hydroxyeicosatetraenoic acid (15-HETE), 12-Hydroxyeicosatetraenoic acid (12-HETE), 5- Hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE), Resolvin D1 (RVD1), Resolvin D2 (RVD2), Resolvin D3 (RVD3), Resolvin D4 (RVD4), Resolvin D5 (RVD5), Maresin 2 (MAR2), Maresin 1 (MAR1), Protectin DX (PDX), Protectin D1 (PD1), 17-hydroxy Docosahexaenoic Acid (17-HDOHE), 14-hydroxy Docosahexaenoic Acid (14 HDOHE), 18-hydroxyeicosapentaenoic acid (18-HEPE), Resolvin E1 (RVE1) and Resolvin E2 (RVE2).

Measurements of soluble cytokines

IL-1β, IL-4, IL-6, IL-13, and IFN-γ were measured in 25μL plasma with a multiplex kit of Luminex technology (Procartaplex, Thermofisher, Waltham, USA). Total TGFβ was also measured with Luminex technology after an acidification step. Luminex analyzes were performed by Genotoul Anexplo platform using the kits EPX01A-20608-901 and EPX010-20440-901 (Biorad, Hercules, USA), according to the manufacturer's instructions.

Fungal load evaluation

P. murina fungal load was determined on a 20μL-sample of crushed lung homogenate. Extraction was performed using DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen), in accordance to the manufacturer's instructions. A quantitative PCR (qPCR) was performed as previously described by Vestereng *et al.* (19) using the primers vhv5a (5-TTCCGGCCTCTTAAAGGTCG-3) and vhv3a (5-CTAGGATGTTCCATAGCCGC-3) and the fluorescence-resonance energy transfer (FRET) probes MDHFR1 (5-AGACAAGGAATACATTGTGCAAGAT-fluorescein-3) and MDHFR2 (5-LC Red 640-TGGATGATGCTTTAGAACTTCT-phosphate-3). The PCR reaction was performed as a touch-down procedure. The reactions were brought to 95°C for 10 min to activate the Taq Polymerase before cycling was performed. The first 5 cycles included denaturation at 95°C, annealing at 65°C for 10 s, and

extension at 72°C for 10 s. For the next 5 cycles, the annealing temperature was lowered to 60 °C, and finally, to 55 °C for the last 35 cycles. The qPCR was performed on LightCycler480 (Roche, Bâle, Switzerland).

Statistics

A non-parametric Mann-Whitney test was used to compare the results of inflammation and infection parameters within the different groups. A Spearman nonparametric test was performed for all the correlation tests. Statistical analyzes were performed using GraphPad Prism version 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA). The differences were considered significant with a p-value <0.05.

RESULTS

Fungal load and clinical evaluation in Immunocompetent and immunosuppressed mice infected with *P. murina*

The evolution of the disease was first evaluated with a quantification of the lungs fungal load *via* qPCR and a measure of the respiratory rate to assess the respiratory function of the mice. As expected, the mice in Pm(+) CTC(-) group were able to eliminate the fungus without any modification of the respiratory rate. At the opposite, Pm(+) CTC(+) mice did not clear the fungus at the end of our experiment, six weeks post-infection (p.i). Moreover, their respiratory functions deteriorated significantly at six weeks p.i. Uninfected control mice had no detectable *P.murina* DNA in their lungs and did not show any significant variation of their respiratory rate (data not shown).

There was no significant weight loss of any mice throughout our experiments (data not shown), although mice receiving corticosteroids had globally a lower weight (mean weight of 16.5 mg vs 19.8 mg for mice that did not receive corticosteroids).

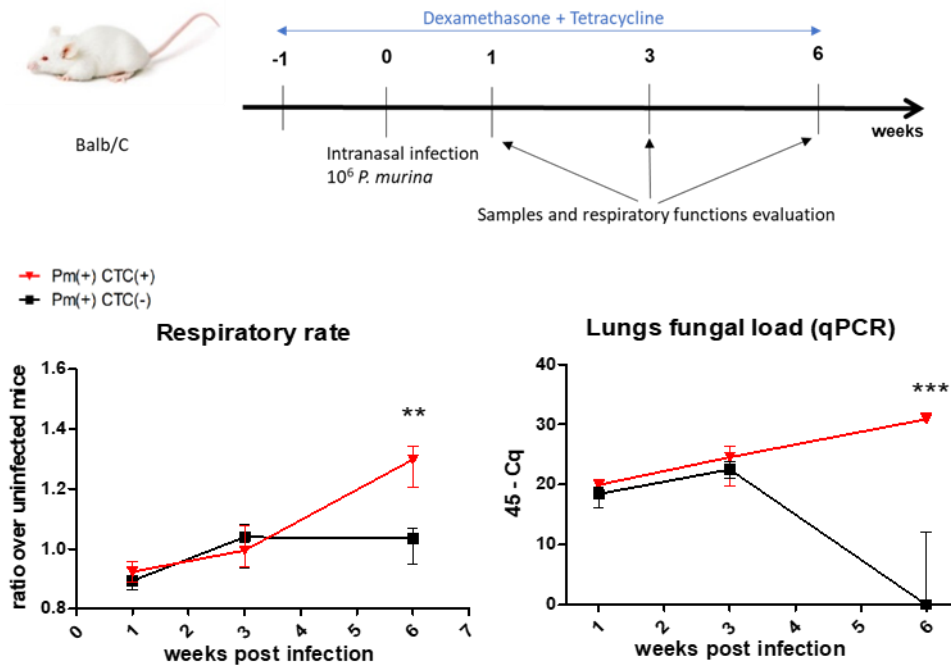


Figure 1: Respiratory rate and *Pneumocystis murina* fungal load quantification

n=8 mice in two separated experiments for the fungal load. Cq: quantification cycle threshold. n=8 mice in one experiment for respiratory rate. *: significant difference between the two groups. One symbol: p<0.05 ; two symbols: p<0.01 ; three symbols p<0.001.

Histopathology observations and Immunohistochemistry in Immunocompetent and immunosuppressed mice infected with *P. murina*

Histopathological evaluation of the lungs tissues was realized in all mice at 1 week, 3 weeks and 6 weeks post-infection. At 1 week post infection, no histopathological abnormalities were found in any mice from all of the groups studied (data not shown). Pictures of Hematoxilin Eosin stained lungs sections at 3 and 6 weeks post infection are reported in figure 2A. In Pm(+) CTC(-) group, mice had large infiltrations of leukocytes in peribronchial and perivascular regions at 3 weeks post-infection. At 6 weeks post infection, there was no longer any leukocyte infiltrate in the mice lungs and the pulmonary parenchyma structures were comparable to naive mice. No exsudate was observed in the alveolar tissue at 3 weeks or 6 weeks post infection. Concerning Pm(+) CTC(+), kinetics and observations were different from the previous group as these mice had a relatively normal lung structures at 3 weeks post-infection with very few leukocyte infiltration and no alveolar exsudate. In contrast, at 6 weeks post infection, Pm(+) CTC(+) mice had an important leukocyte infiltration and a large part of their alveolar tissue was filled with a heterogenous exsudate. These important

inflammation and lung structure modifications observed at 6 weeks are in concordance with the observed reduction of these mice's pulmonary functions.

Grocott-Gomori silver staining of the lung sections was also performed on successive lung sections to the ones used for HE staining, to evaluate *Pneumocystis* cysts localization in the lung structure (figure 2B). In Pm(+) CTC(-) mice, lungs contained few visible cysts at 3 weeks post-infection and none in the regions of peribronchial infiltrates observed in HE. At 6 weeks post infection, there was no detectable cyst on lung sections, in consistency with the qPCR result. On the other hand, in Pm(+) CTC(+) mice, there were rare cysts observable at 3 weeks post infection but at 6 weeks post infection, there was a large number of cysts, distributed in numerous regions of the whole lungs. *Pneumocystis* cysts were preferentially located in the alveolar tissue, where leukocyte appeared numerous on the same HE-stained thick sections, suggesting that these leukocytes seemed not efficient or not sufficient to clear *Pneumocystis*.

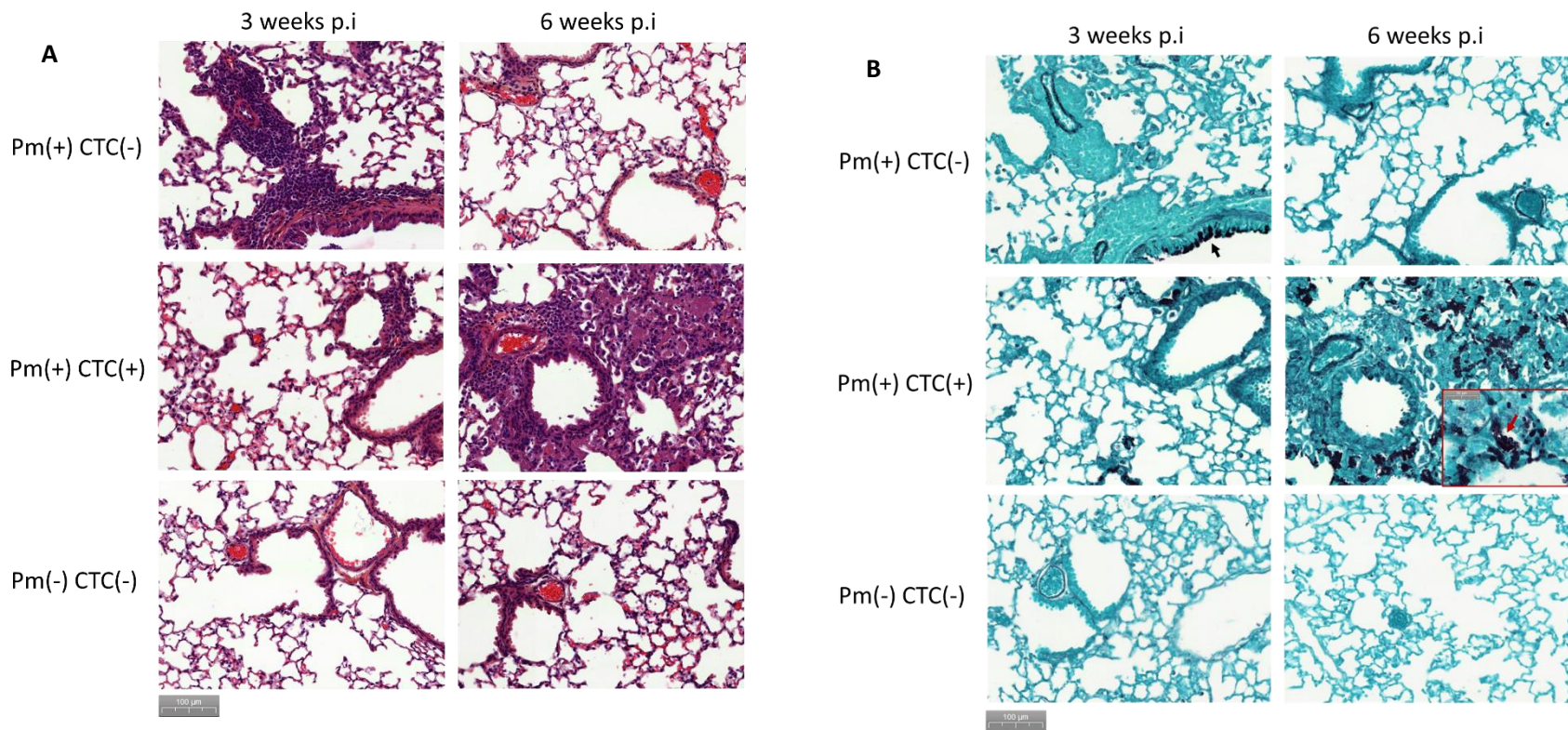


Figure 2: Histopathology of successive lung sections stained with Hematoxylin eosin and Gomori Grocott

A: Hematoxylin eosin staining of lung sections from mice of infected groups and naive group at 3 weeks and 6 weeks post infection. B: Grocott-Gomori silver staining of lung sections from mice of infected groups and naive group at 3 weeks and 6 weeks post infection. *Pneumocystis* cysts are stained in black over a green background (pointed by red arrow). The picture surrounded by a red frame correspond to a zoom in a zone of the associated picture. Mucine present in the mucus produced by goblet cells are also stained in black, as shown by the black arrow. n= 8 mice in two separate experiments.

Subsequently, 4 different immunohistochemistry stainings were performed on the mice lung sections. B lymphocytes, T lymphocytes, macrophages and polymorphonuclear neutrophils lungs infiltrations were observed that way, on successive lung sections for each mouse (figure 3). Pictures of Pm(-) CTC(+) mice's lungs are not reported since they did not show any difference from the lungs of naive mice.

A first major difference between Pm(+) CTC(+) and Pm(+) CTC(-) groups concerned B cells. Indeed, the immunocompetent mice presented an infiltration of B cells at 3 weeks p.i, that represented most of the cells in the peribronchial leukocyte infiltrates. Meanwhile, there was no or very few B cells in the lungs of immunosuppressed mice 3 or 6 weeks post-infection. On the T cells part, there were some T cells in the structured peribronchial leukocyte infiltrates of Pm(+) CTC(-) mice, located at proximity to the B cells. In Pm(+) CTC(+) mice, T cells started to increase at week 3 in comparison to naive cells and were even more numerous at week 6. They accumulated mostly in the peribronchial zone as well. Macrophages were clearly increased at week 3 post infection in the two groups of infected mice (immunocompetent and immunosuppressed). But at week 6 post infection while the quantity of macrophages reduced in Pm(+) CTC(-) mice, it was still high in Pm(+) CTC(+) mice. There was a remarkable higher number of PMN in Pm(+) CTC(+) mice already at week 3 p.i and also at 6 weeks p.i. These PMN were distributed around bronchial tubes and in the alveolar tissue. At the opposite, there were few PMN in Pm(+) CTC(-) mice, with a comparable level to the naive mice.

The peribronchial-lymphocyte infiltration, containing mostly B cells, strongly suggested a tertiary lymphoid structure of the iBALT type (induced bronchus-associated lymphoid tissue) as already reported during *Pneumocystis* infection (20). IL-6, a critical regulator for iBALT formation. Pm(+) CTC(-) mice had a significantly increased plasma concentration at 3 weeks p.i (median ratio over uninfected mice = 1.8), concomitantly with the observation of the iBALT-suggestive structure in Pm(+) CTC(-) mice. IL-6 concentration decreased at 6 weeks p.i, when the iBALT was no longer observable in the lungs of the mice (figure 4). Conversely, Pm(-) CTC(-) mice that had a limited B cell lung infiltration and no iBALT-suggestive structure, did not have any variation of IL-6 plasma concentration (either at 3 or 6 weeks p.i). Furthermore, iBALT structure is generally associated with M2-polarized-macrophages that produce lower levels of pro-inflammatory cytokines, among them IL-1 β . Pm(+) CTC(-) mice had a reduced plasma IL-1 β concentration at week 1 and week 3 p.i (median ratio over uninfected mice = 0.6 at both times) and was significantly lower than Pm(+) CTC(+) mice at week 1 p.i. Then IL-1 β increased back to the Pm(+) CTC(+) group level at 6th week p.i, after the fungus disappeared (figure 4). IL-1 β plasma concentration was not modified in the Pm(+) CTC(+) mice.

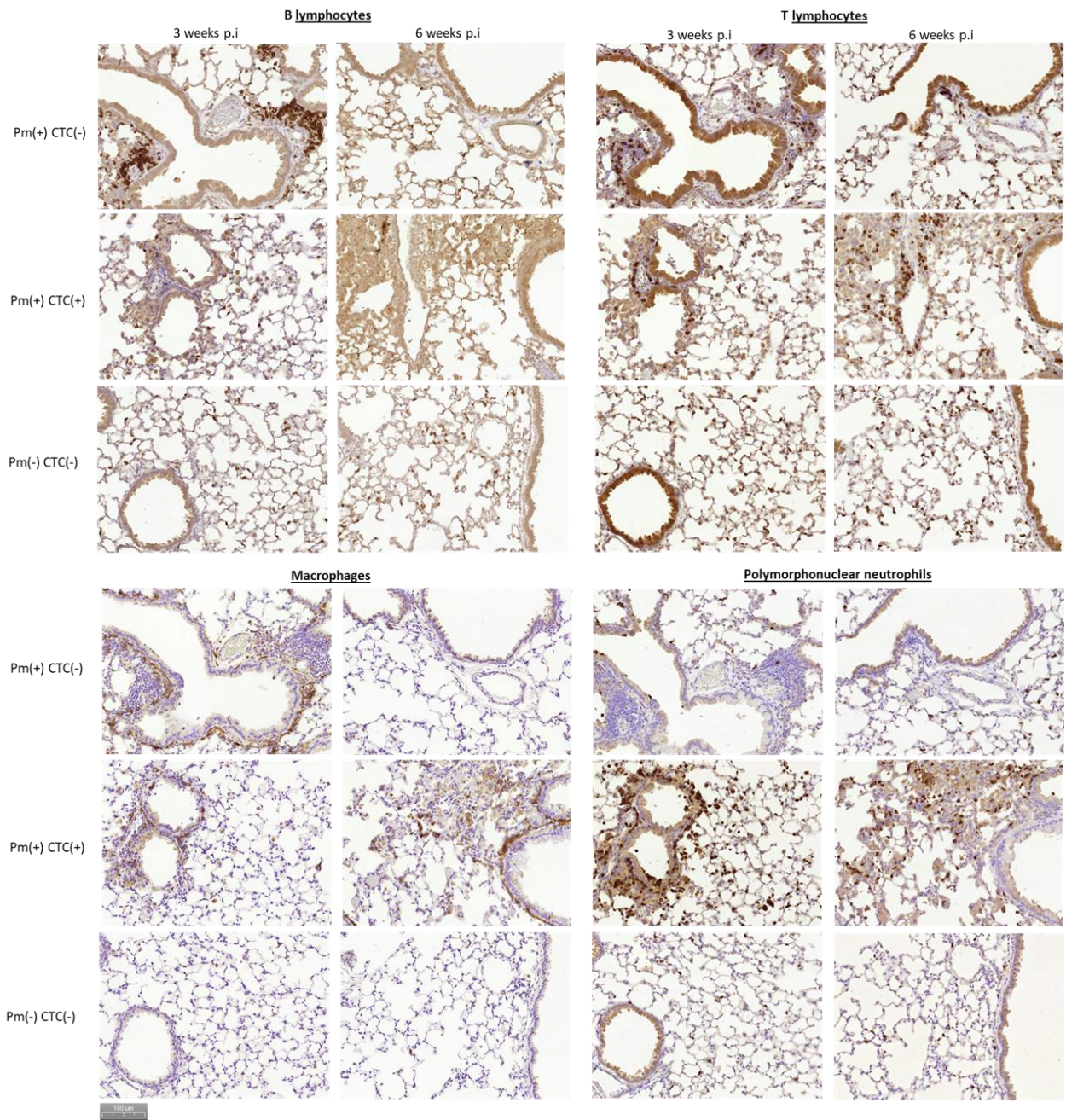


Figure 3: Immunohistochemistry of successive lung sections

B lymphocytes, T lymphocytes, macrophages and polymorphonuclear neutrophils were stained with DAB- labeled antibodies targeting B220, CD3, F480 and Ly6G, respectively. Staining were performed on the lungs sections from two mice for each group. DAB staining corresponds to the dark brown color. Brown staining of mucus in T lymphocyte staining, as pointed by the black arrows is not specific.

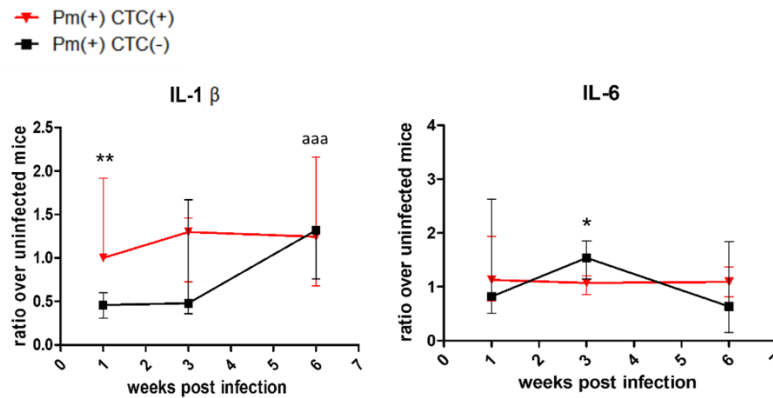


Figure 4: IL-1 β and IL-6 plasma concentrations

n=8 mice in two separated experiments for the fungal load *: significant difference between the two groups Pm(+) CTC(+) and Pm(+) CTC(-) ; aaa: significant difference with week 1 result for Pm(+) CTC(-) group. (p <0.001).

Lymphocyte immunophenotyping in Immunocompetent and immunosuppressed mice infected with *P. murina*

T lymphocytes' phenotypes were further analyzed in the lungs with flow cytometry (figure 5). The mice from Pm(+) CTC(-) group showed a significant increase of CD3 T cell number at 6 weeks without total CD4 or CD8 T cells proportion variation during the 6 weeks of the experiment. Activated CD4 T cells (CD4+ CD44+) and CD8 T cells (CD8+ CD44+) were increased significantly at week 3 p.i and returned to a basal level at 6 weeks p.i, when *Pneumocystis* was cleared from the lungs. At week 3, during the peak of infection in group Pm(+) CTC(-), CD4 T cells showed a significant increase of Th1 profile (IFN γ + CD4 T cells) and of Th2 profile (IL13+ CD4 T cells) in comparison to week 1 p.i. Th17 cells (IL17+ CD4) and IL-10+ CD4 T cells also tended to be increased at week 3 even though not significant (p=0.0830 for the two CD4 subpopulations). Cytotoxic CD8 T cells producing granzyme B were not modified in immunocompetent mice during the infection.

Pm(+) CTC(+) mice had also a significant increase of T lymphocyte number at 6 weeks p.i, as observed in immunohistochemistry. There was no modification in CD4 or CD8 T cells proportions from week 1 to week 6 p.i. The activation of CD4 T cell was delayed in comparison to Pm(+) CTC(-) mice with a substantial increase only at 6 weeks p.i, corresponding to the PCP phase in this group. CD8 T cells were activated earlier, at 3 weeks p.i and increased significantly at 6 weeks p.i like CD4 T cells. Moreover, in contrast to Pm(+) CTC(-) group, CD4 T cell activation showed a strong increase of all T helper profiles (Th1, Th2 and Th17) at 6 weeks p.i (p=0.0002, p=0.01, p=0.0070 respectively). The anti-inflammatory cytokine IL-10 production was also increased at 3 weeks p.i (p=0.0070) but not significantly at 6 weeks p.i (p=0.1605). Conversely, the CD8 T cells were strongly differentiated toward a strong Tc1 response at 6 weeks p.i, with a high production of both IFN γ and granzyme B.

When comparing Th1/Th2 ratio in the lungs at the peak of the infection for the two groups [week 3 p.i for Pm(+) CTC(-) mice and week 6 p.i for Pm(+) CTC(+) mice], it was significantly lower in the Pm(+) CTC(+) mice than in Pm(+) CTC(-) group.

Plasma concentration of IFN γ was strongly increased at 6 weeks p.i ($p=0.0009$) whereas it was not modified in the Pm(+) CTC(-) mice. IL-13 and IL-4 cytokines were undetectable in the plasma. Furthermore, there was neither significant difference in CD4 regulatory T cells in the spleen between the two groups nor any increase during the infection in either group (data not shown).

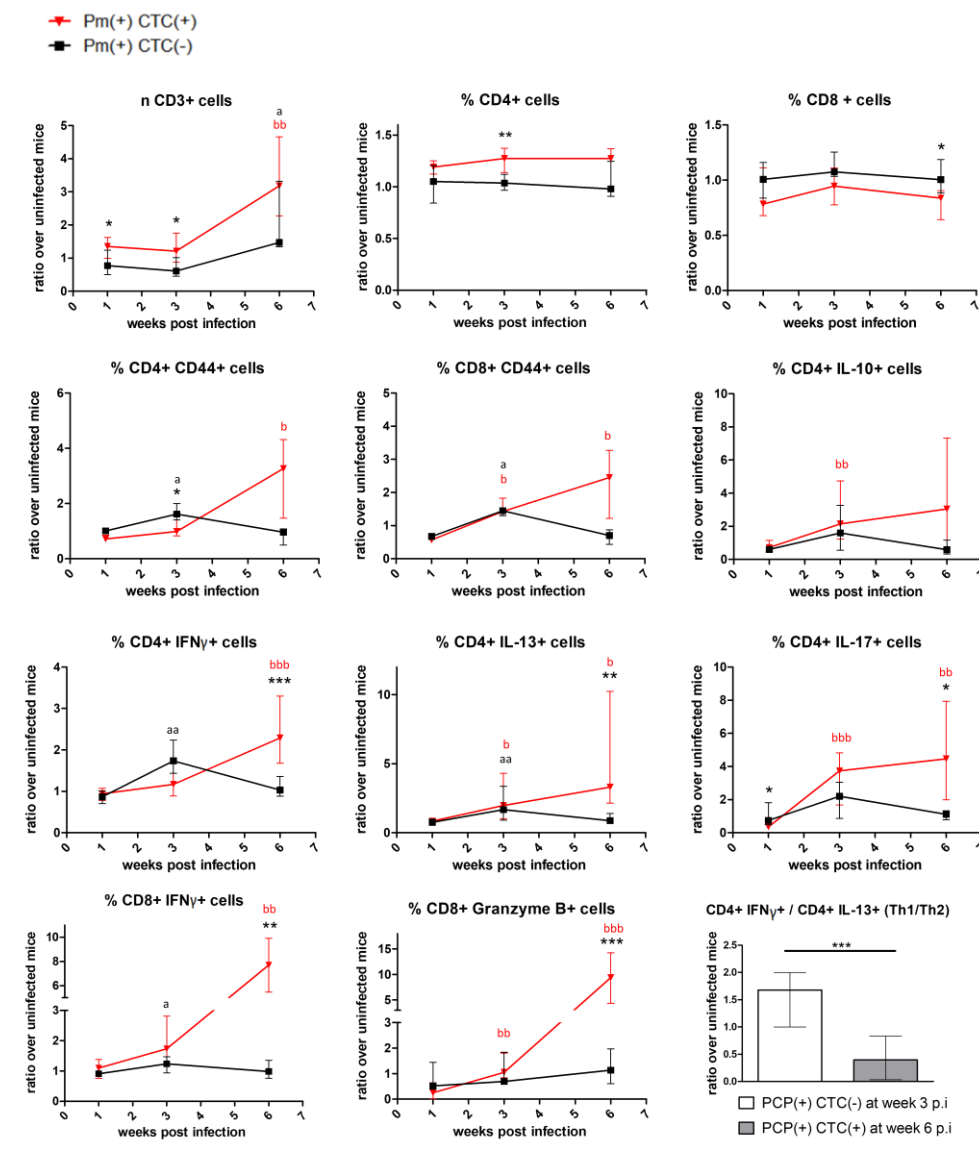


Figure 5: Lungs lymphocyte phenotypes

The final graph at the low right corner represents the Th1/Th2 ratio of Pm(+) CTC(-) at week 3 p.i and of Pm(+) CTC(+) at week 6 p.i. Results are expressed as ratios over the corresponding [CTC(+) or CTC(-)] uninfected control group. n=8 mice in 2 separated experiments; *: significant difference between the two groups Pm(+) CTC(+) and Pm(+) CTC(-); a: significant difference with week 1 result for Pm(+) CTC(-) group; b: significant difference with week 1 post infection result for Pm(+) CTC(+) group. If one symbol: $p < 0.05$, if two symbols: $p < 0.01$, if three symbols: $p < 0.001$.

LM pulmonary concentrations in Immunocompetent and immunosuppressed mice infected with *P. murina*

Pro-inflammatory and pro-resolving lipid mediators were measured in the grinded lungs of the mice. In the lungs of Pm(+) CTC(-) mice, the only SPM that increased during the course of the infection were Lipoxin A4 between week 1 and 6 and Resolvin D2 at 3 weeks post infection. The pro-inflammatory prostaglandin E2 (PGE2) was increased at 3 weeks post infection and was significantly higher than in the mice Pm(+) CTC(+) at this time of infection (median ratio over uninfected mice = 1.5). PGE2 concentration went back to the basal level at 6 weeks post-infection, when the *Pneumocystis* infection was controlled. 15-HETE, which is an intermediate metabolite in SPM production but has pro-inflammatory effects itself, was modified in the same way, with a significant increase at 3 weeks post infection.

Concerning Pm(+) CTC(+) mice, there was a global increase of SPM at 6 weeks post infection. Indeed, the inflammation pro-resolving protectins DX and D1, maresins 1 and 2, resolvins D4 and D5, resolvin E2 and lipoxin A4 were significantly increased at the end of our experiment, despite the still increasing fungal load. Except for resolvin D4 and lipoxin A4, their concentration was also significantly higher than the one in the lungs of Pm(+) CTC(-) mice. Considering pro-inflammatory eicosanoids, PGE2 was highly increased at 6 weeks p.i (median ratio over uninfected mice = 2.8) and significantly higher than the concentration in Pm(+) CTC(-) mice. Although Thromboxane B2 concentration at 6 weeks p.i was also higher than the one of immunocompetent mice, it did not increase over the time of infection.

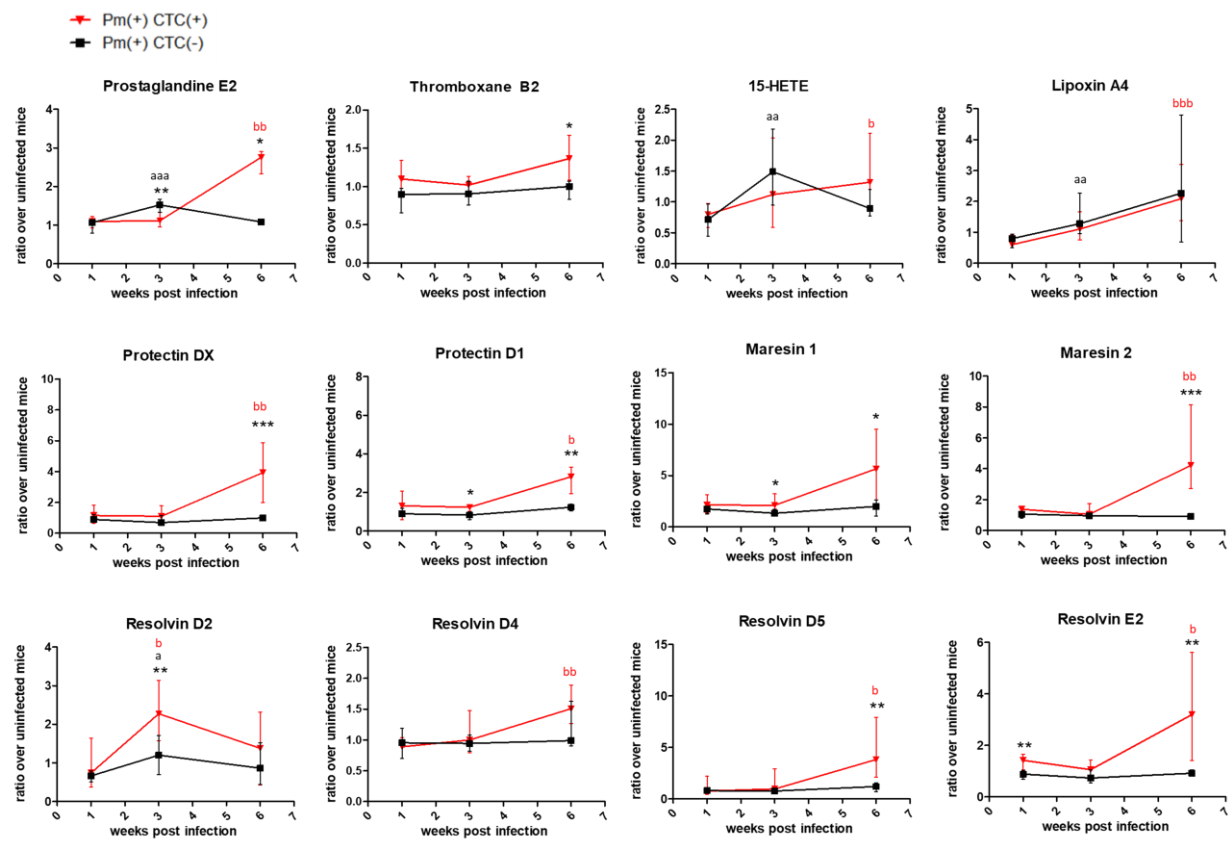


Figure 7: Pro-inflammatory and pro-resolving lipid mediators concentrations in the lungs

Results are expressed as ratios over the corresponding [CTC(+) or CTC(-)] uninfected control group. n= 8 mice in 2 separated experiments. *: significant difference between the two groups Pm(+) CTC(+) and Pm(+) CTC(-) ; a: significant difference with week 1 result for Pm(+) CTC(-) group ; b: significant difference with week 1 post infection result for Pm(+) CTC(+) group. If one symbol: p <0.05, if two symbols: p <0.01, if three symbols: p <0.001.

Effects of Omega 3 and Omega 6 enrichment diets on PCP evolution

In order to further analyze the impact of the increased lipid mediators that we observed in the Pm(+) CTC(+) mice, we attempted to modify LM concentrations in infected immunosuppressed mice by modifying the LM precursors intake. Omega 6 (w6) and Omega 3 (w3) fatty acids (FA) are unsaturated essential FA that are only obtained from the food for mammals. The w6 FA are the precursors of arachidonic acid and its derivatives as well as the precursors of lipoxins. W3 FA are the precursors of resolvins, protectins and maresins among other lipid mediators.

A group of infected and immunosuppressed mice received a diet enriched in w3 FA while another group received a diet enriched in w6 FA. All the clinical, fungal and inflammatory parameters of these

mice were compared to the ones of the Pm(+) CTC(+) mice described previously that received a classical diet.

Pneumocystis fungal load at 6 weeks p.i was lower in the mice that received more w6 FA compared to the mice with classical diet (figure 8). Moreover, the clinical evaluation revealed a lower respiratory rate at 6 weeks p.i in the mice receiving w6-enriched diet compared to the mice with the classical diet [Pm(+) CTC(+) mice] (figure 8), compatible with improved lung function in this group (figure 8). There was no significant difference in either the fungus elimination or the respiratory rate for the mice that received w3 FA.

There was no significant reduction of weight in the mice with modified diets during the time of experiment (data not shown).

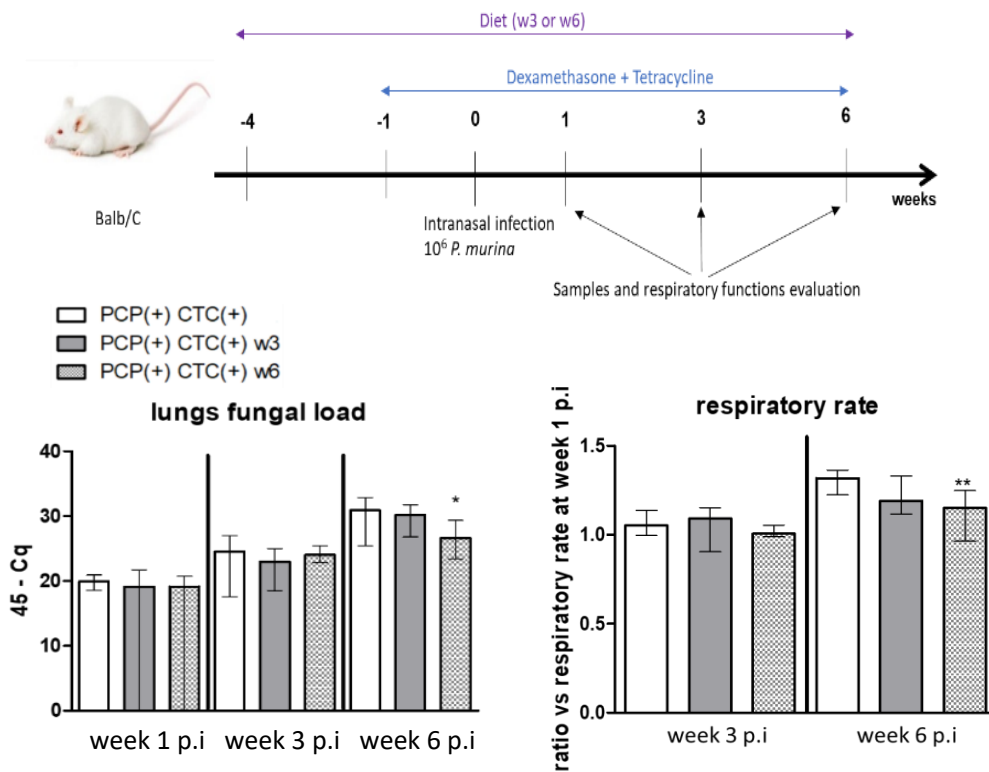


Figure 8: Lungs fungal load and respiratory functions evaluation

n=8 mice from two separated experiments for lungs fungal load. n=8 for respiratory rate in one experiment. The respiratory rate was counted in the mice that were sacrificed the following day at 1, 3, 6 weeks post infection. The results are expressed as a ratio over the respiratory rate mean at 1 week post infection for the corresponding group to better appreciate the evolution of the respiratory function during the infection. *: significant difference between the two groups. One symbol: $p < 0.05$; two symbols: $p < 0.01$.

The histopathologic HE observations showed a reduced leukocyte infiltration and a lower quantity of exsudate in the alveoli of mice receiving w3-enriched diet. There was no observable difference in the quantity of exsudate in mice receiving w6 FA but it seemed to be globally less leukocyte infiltration in the lungs in comparison to the mice that received a classical diet.

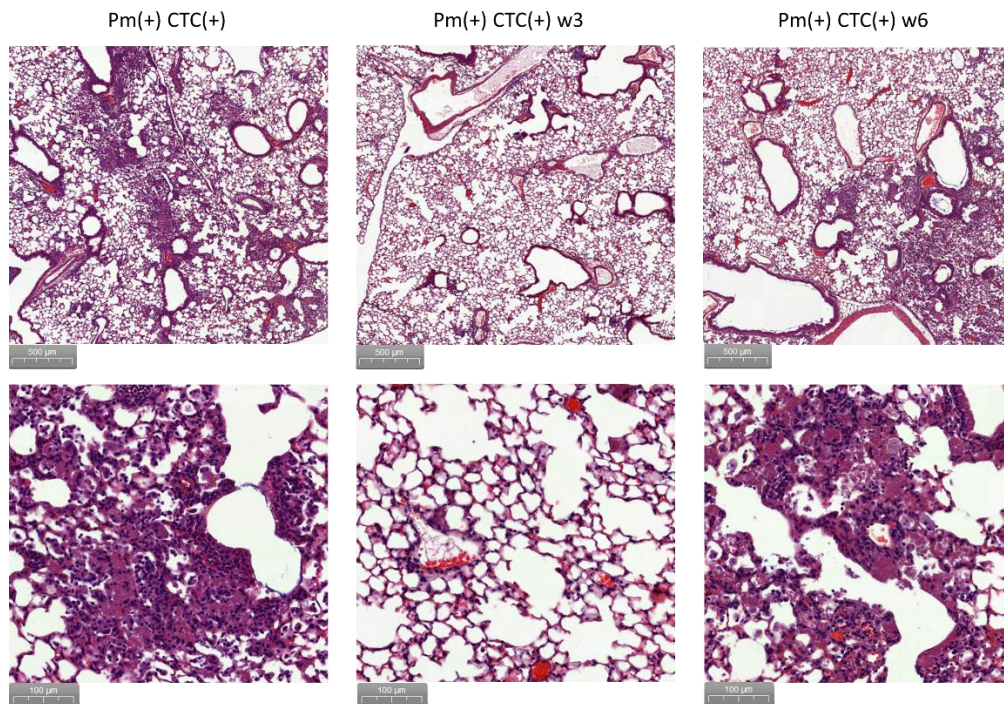


Figure 9: Histopathology of the lung sections of the infected immunosuppressed mice with different diets at 6 weeks p.i Hematoxylin eosin stained lungs sections of each group of mice at six weeks p.i Above images are a global view of the lungs while below pictures are a zoom on alveolar and bronchus regions coming from the above pictures.

Effects of Omega 3 and Omega 6 enrichment diets on LM and lymphocyte subpopulations

The evaluation of pulmonary LM concentrations were performed in the three groups of PCP mice with different lipid diets. The evolution of LM concentration, at 1, 3 and 6 weeks p.i, are represented in figure 10 for the three different groups. Mice receiving the w3-enriched diet showed significantly higher concentrations of the omega 3-derived SPM in comparison to the mice with classical diet [Pm(+) CTC(+)] (RVD1, RVD2, RVD3, RVD4, MAR2, PDX and also RVD3, MAR1 and intermediate SPM metabolites 17HODHE, 14-HODHE, 18-HEPE that are not shown). They also had lower concentrations of pro inflammatory LM or metabolites produced from w6 FA (PGE2 and TXB2) and w6-derived SPM

(LXB4). Moreover, the higher concentration of w3-derived SPM were generally observed since the week 1 p.i (data not shown).

Concerning mice with w6-enriched diet, the concentrations of some SPMs produced from w3 FA were reduced in comparison to the mice with classical diet (RVD2, RVD5, a trend for RVE2 $p=0.07$, and the metabolite 14 HDOHE that is not shown). Nonetheless, their concentration in w3-derived Resolvin D2 was higher than the mice with classical diet. Moreover, despite the addition of w6 FA, the concentrations of proinflammatory LM PGE2 and the thromboxane A2 metabolite (thromboxane B2), both coming from the w6 pathway were reduced at 6 weeks p.i in comparison to the concentrations found in the mice with the classical diet. There was neither significant impact of the w3-diet nor w6-diet on the w6-derived SPM (LXA4) nor LM intermediate metabolites (15-HETE, 12-HETE, 5-HETE) nor w3-derived PD1 SPM.

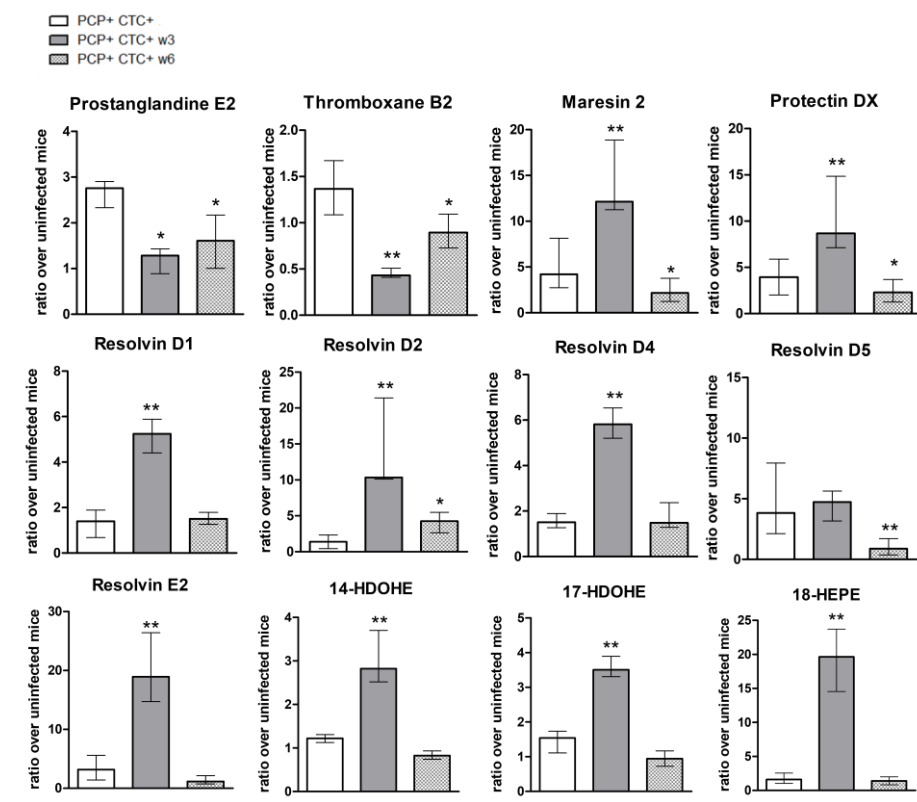


Figure 10: Lipid mediators pulmonary concentrations at 6 weeks post infection according to fatty acid diet
 n=8 for the group of Pm(+) CTC(+); n=4 for Pm(+) CTC(+)-w3; n=4 for Pm(+) CTC(+)-w6. *: significant difference with the result of Pm(+) CTC(+) mice with classical diet. One symbol: $p < 0.05$, Two symbols: $p < 0.01$.

Lymphocytes phenotypes in the lung of the three groups of mice with classical or modified diets at 6 weeks p.i, were determined by flow cytometry and are represented in the figure 11. The number of T lymphocyte (CD3+ cells) in the lungs was reduced in the two groups of mice with lipid-enriched diets. CD4 T cell proportion was significantly increased in the mice with enriched-w6 FA diet while CD8 proportion was significantly reduced in the enriched-w3 FA group compared to the mice with classical diet. In comparison to the mice without FA enrichment, the group receiving enriched w3-diet had a significant reduction of Th1 (CD4+ IFN γ + cells) and Th2 (CD4+ IL13+ cells) CD4 T cells subsets, with a trend for Th17 (p=0.07). All of these populations had proportions comparable to the uninfected control mice (median ratios were 1.2, 1.2 and 1.09 for Th1, Th2 and Th17 respectively). There was no significant difference for CD8+ IFN γ + cells nor for CD8+ granzyme B+ cells (data not shown). The w6 diet also modified T helper proportions with a significant reduction of CD4+ IL13+ cells in comparison to the group with classical diet and a non-significant trends for a lower Th1 response (CD4+ IFN γ + cells) (p=0.1). Ratio of CD4+ IFN γ + / CD4+ IL-13+ was significantly increased in the group of mice with w6-enriched diet, as it was for the mice with w3-enriched diet. There was no significant difference of regulatory CD4 T cells between the three groups (data not shown).

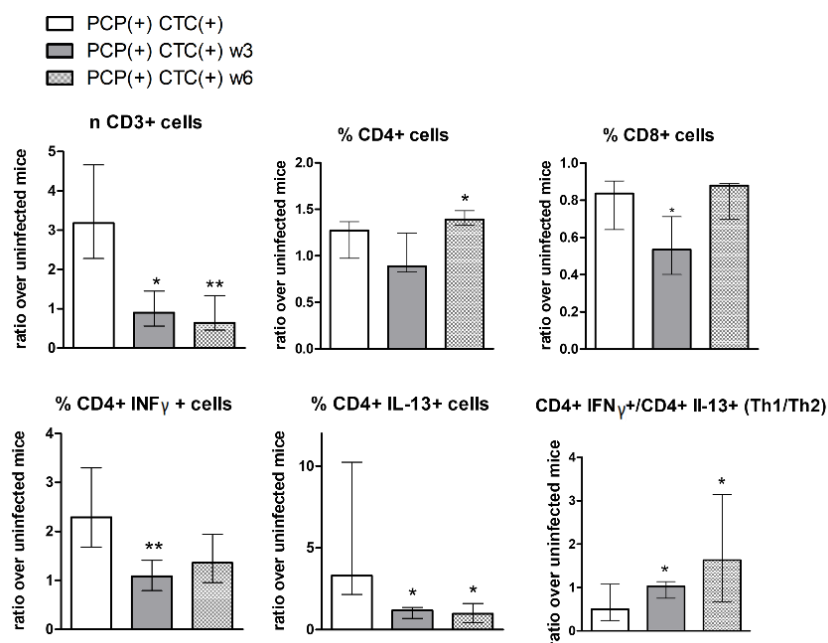


Figure 11: Pulmonary lymphocytes phenotype according to fatty acid diet at 6 weeks post infection

Group of Pm(+) CTC(+); n=4 for Pm(+) CTC(+) w3; n=4 for Pm(+) CTC(+) w6 for cytometry analyses

*: significant difference with the result of Pm(+) CTC(+) mice with classical diet. One symbol: p<0.05, Two symbols: p<0.01, three symbols: pvalue <0.001.

Correlation between CD4 T helper responses, fungal load and PGE2 concentration

The relationship between CD4 T helper profiles in the lungs and *Pneumocystis* fungal load was evaluated with non-parametric correlation. Th2 profile was significantly correlated with the fungal load ($p=0.0009$) and the higher the CD4 Th2 proportion was, the higher the fungal load was. Th1 was also positively correlated with the fungal load ($p=0.0350$). However, Th1/Th2 ratio was negatively correlated with the fungal load. The lower Th1/Th2 ratio was, the higher the *Pneumocystis* fungal load was.

Given that pro-inflammatory PGE2 has been reported to favor a Th2 response over Th1, correlation tests (Spearman) were performed to evaluate if there was a connection between PGE2 and the Th2 and Th1 CD4 populations in these experiments. PGE2 was found to be positively correlated with both Th2 and Th1 proportions of CD4 T cells ($p<0.0001$ and $p=0.0004$, respectively). However, it was negatively correlated with Th1/Th2 ratio. Correlation tests between Th profiles and the two other measured pro-inflammatory eicosanoid or metabolites (6-kPGF1 and TXB2) were performed and did not show any significant results. Because a low Th1/Th2 ratio was associated with a high *Pneumocystis* fungal load in immunocompromised infected mice, a direct correlation between PGE2 concentration and the fungal load was tested and revealed a significant positive correlation ($p=0.0024$).

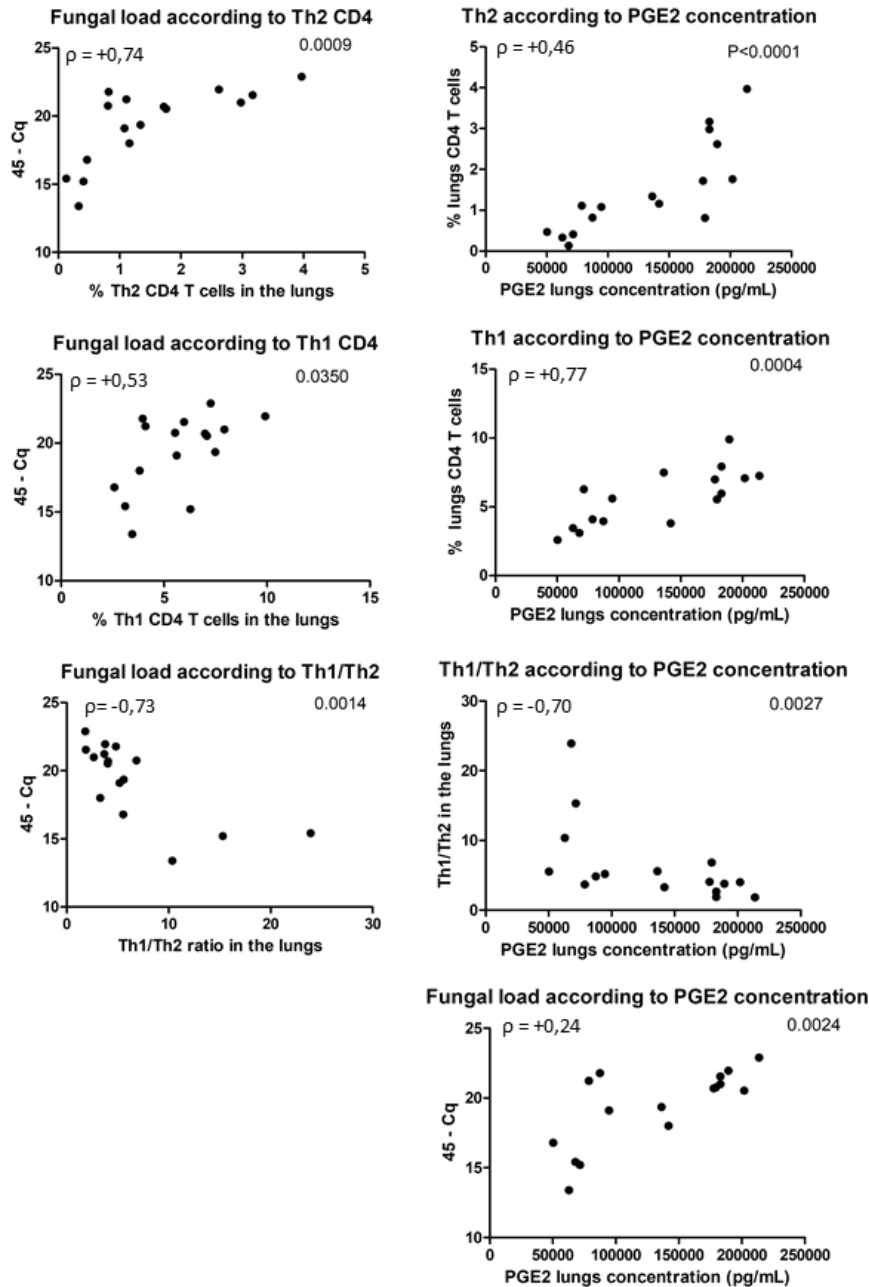


Figure 12: Non parametric correlation tests (Spearman) between CD4 T helper populations, the fungal load and PGE2 pulmonary concentrations.

n = 16 mice at 6 weeks p.i from the groups Pm(+) CTC(+), Pm(+) CTC(+) w3 and Pm(+) CTC(+) w6. Spearman's coefficients (ρ) are reported on the top-left corner of the figures. P value results are reported at the top-right corner of the figures.

DISCUSSION

During a *Pneumocystis* infection, the host inflammation has been implicated in the lung tissue damages and thus the respiratory functions degradation. This study aimed to globally evaluate the leukocytes, cytokines and lipid inflammatory mediators during the course of *Pneumocystis murina* infection in immunocompetent and immunosuppressed mice. As expected, the inflammatory response of the two groups of mice were different. Immunocompetent mice had a limited inflammation that happened mostly at 3 weeks p.i and that reduced rapidly with the elimination of the fungus. Meanwhile, immunosuppressed mice presented a delay in the inflammatory response that was increased highly at 6 weeks p.i, without any clearance of the fungus. The strong inflammatory response coincided in time with the mice clinical degradation.

Immunocompetent and immunosuppressed mice had different cell infiltration and lymphocyte profiles. Indeed, at 3 weeks p.i, immunocompetent mice had a strong infiltrate of B lymphocytes that were localized near the bronchus and the vessels, in a large structure that contained also T cells and macrophages. These organized structures could correspond to inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT). iBALT is a tertiary structure composed of B lymphocytes and T follicular helper cells (Tfh) that can form after some antigenic stimuli such as an *Influenza* virus infection or a *Mycobacterium tuberculosis* infection (21). iBALT formation has been described recently during *Pneumocystis* infection in immunocompetent mice by Eddens *et al.* (20).

These observations confirm the important role of B cells in PCP as it has been increasingly discussed in the last years (22). Indeed, a single depletion of B cells triggers a susceptibility to PCP in mice (11,23,24) and in humans receiving anti-CD20 mab therapies (25,26). B lymphocytes requirement in PCP would be more related to its role in CD4 T cells activation than to their production of antibodies (11,27,28). The increase of IL-6 observed at 3 weeks p.i in the plasma of immunocompetent infected mice is also an argument for the iBALT structure. Indeed, IL-6 is required for the development of an iBALT, for its capacity to attract and activate B cells to the inflamed tissue and for the differentiation of CD4 T cell toward a Tfh phenotype (29,30). Moreover, the cytokine IL-1 β produced by activated macrophages were found in low concentrations in the plasma of Pm(+) CTC(-) at both 1 and 3 weeks p.i. This could be related to a M2 polarization of the macrophages, that produce reduced quantities of IL-1 β (31). Macrophages with M2 polarization have been associated with iBALT structures. Rong *et al* have also shown a connection between IL-10 produced by B cells and a M2 polarization of macrophages during PCP (32). In these conditions, conventional Th1, Th2 and Th17 responses could have a limited impact during *Pneumocystis* infections, and the immune response seems to be mostly related to B cells, CD4 Tfh and the final macrophage effector cells. Eddens *et al* found that a depletion of Th2 or Th17 CD4 T

cells did not hinder iBALT formation but limited it, leading to an increase of fungal load (20). In this study, both Th1 and Th2 CD4 were increased in the lungs as it was already reported (33) while Th17 tended to increase (not significantly). CD4 T follicular cells were not evaluated and it would be of great interest to look specifically at this CD4 subset in further experiments on immunocompetent mice infected with *P.murina* to confirm those results.

In contrast, the immunosuppressed infected mice treated with corticosteroids had no iBALT structure and were almost completely depleted of B cells, as observed in immunohistopathology. The connection between corticosteroids and the depletion of B lymphocytes has been recently underscored in a transcriptomic study of leukocyte in *Pneumocystis*-infected mice (34). Moreover, in our study, immunosuppressed infected mice did not show any variation of IL-6. Several studies have shown a link between glucocorticoid therapy and a reduction of IL-6 secretion by monocytes, epithelial and endothelial cells (35,36). Thus, corticosteroid could inhibit the formation of iBALT, through multiple actions targeting directly or indirectly B cells, IL-6 and CD4 T cells.

In our study, CD4 T cell activation was delayed in immunosuppressed infected mice and all type of T helper were increased at 6 weeks p.i. An increase of both Th1 and Th2 cytokines was previously reported by Swain *et al* (23). In this study, a preferential CD4 differentiation toward Th2 in the lungs has been observed. A high proportion of Tc1 CD8 with a production of IFN γ and Granzyme B was observed in the lungs of these mice whereas it was not observed in immunocompetent mice. This important increase of CD8 T cells has been previously reported in CD4 depleted mice infected with *P. murina*. CD8 T cells population was associated with a reduced fungal load in murine experiments (37), in particular cytotoxic Tc1 CD8 (38). CD8 T cells were not able to individually eliminate *Pneumocystis in vitro* but they improved the macrophage capacity to kill the fungus (39). Nandakumar *et al* reported that the capacity of macrophages to eliminate *P. murina in vivo* was improved with a M1 macrophage rather than a non-polarized macrophage (40).

The difference of immune response according to the infected host immune status has already been suggested in a recent publication. Indeed, Nandakumar *et al.* reported a major M2 macrophage polarization in immunocompetent rat while immunosuppressed rats had mainly a M1 macrophage polarization (40).

Concerning lipid mediators, they were poorly increased in immunocompetent mice except for the pro-inflammatory PGE2 eicosanoid and for the SPM RVD2 and LXA4. The three LM were increased at 3 weeks p.i when the fungal load was maximal and returned back to the basal level at 6 weeks p.i when *Pneumocystis* was *quasi* undetectable. In immunosuppressed mice, almost all SPMs evaluated in this study were significantly increased at 6 weeks p.i as well as pro-inflammatory PGE2 and Thromboxane

B2 (metabolite of thromboxane A2). The increase of SPMs at 6 weeks p.i could be correlated to the strong inflammation observed at this time of the infection and therefore could be interpreted as an attempt of the host organism to regulate the excessive inflammation. A previous work has shown a production of PGE2 by alveolar macrophages stimulated *in vitro* with *Pneumocystis* (41). However, SPM are not always favorable to the evolution of certain disease. Indeed, in some infectious pathologies, the addition of SPM has been associated with a detrimental effect on the disease evolution. Hence, the adjunction of lipoxin A4 to mice infected with *M. tuberculosis* increased the mortality of the mice (42) while the adjunction of lipoxin A4 to mice infected with *Toxoplasma gondii* improved the mortality but increased the parasite load (43).

We attempted to modify the LM concentrations in infected immunosuppressed mice in order to better understand the implication of these molecules in the disease. The w3-enriched diet induced an increased concentration of the SPMs derived from w3 FA (i.e resolvins, protectins and maresins) and a decrease of pro-inflammatory eicosanoids PGE2 and TXB2 that are produced from w6 FA. As expected, the w6 FA diet reduced different SPM of w3 families (protectin DX, maresin 2 and Resolvin E2) while resolvin D2 was increased in comparison to the group receiving the classical diet. More surprisingly, mice with w6-enriched diet had also significant reduction of eicosanoids PGE2 and TXB2 pulmonary concentrations. Thus, while the w3 FA did increase the SPM originating from w3 FA, the w6-enriched diet had more complex effects on eicosanoids and SPM, suggesting potential retrocontrols and/or a more complex regulation of the eicosanoid metabolism.

The w3-enriched diet, associated with increased SPM, did not improve the PCP evolution nor the fungal load clearance and was associated with a global reduction of the proportion of all CD4 T helper subtypes, both in the lungs and in the spleen, without any significant modification of CD8 T cell populations. At the opposite, w6-enriched diet improved the evolution of respiratory functions with a lower fungal load at 6 weeks p.i compared to mice with the classical diet. The improvement of the disease evolution was associated with an increase of Th1/Th2 CD4 T cells ratio in the lungs and in the spleen. The improvement of an infectious disease with an w6-enriched diet has already been reported with a tuberculosis murine model (44). Conversely, the *M. tuberculosis* infection of transgenic mice able to convert w6 FA to w3 showed an increase of the bacterial load in the lungs (45). In each of these experiments, the disease evolution modifications were associated with an increase or decreased macrophages phagocytosis efficiency (44,45).

From these results, correlation tests were performed between *P. murina* fungal load and T helper populations in infected immunosuppressed mice at 6 weeks p.i, when the PCP disease was the most advanced. It revealed a negative correlation between the fungal load and Th1/Th2 ratio, meaning that

the higher the Th1/Th2 ratio was, the lower the fungal load was. So, a high Th1 response seems to favor the lung fungal clearance. The beneficial effect of Th1 on *Pneumocystis* infection in immunosuppressed host has already been demonstrated by the adjunction of IL-12 or IFN γ to infected mice (6,46). One can only suggest that this Th1 beneficial differentiation could have an impact on the macrophages activation and subsequently induce a better phagocytosis of *Pneumocystis*. A required activation by the CD4 Th1 cells for the macrophages to become highly microbicidal has already been suggested in *Pneumocystis* infection (47). The independent T CD8 production of IFN γ observed in the immunocompromised mice can have a limited impact on macrophages without a macrophage sensitization to IFN γ that can be done by the CD40-CD40L communication with Th CD4 or by the addition of lipopolysaccharide (47). On the contrary, Th2 CD4 T cells can produce the anti-inflammatory IL-10 cytokine which deactivates macrophages.

Furthermore, because PGE2 has been associated with a stimulation of Th2 profile (48), correlation tests were done between the eicosanoid and the T helper populations on infected immunocompromised mice at 6 weeks p.i: PGE2 was indeed negatively correlated with Th1/Th2. Then, a direct correlation was tested between PGE2 and the fungal load which resulted in a significant negative correlation. Hence, in a context of immunosuppression, in which a higher Th1/Th2 ratio is beneficial, PGE2 could be detrimental in over-stimulating Th2 response. PGE2 has also been shown to trigger a switch in the production of LM from pro-inflammatory to pro-resolving LM (49,50). Hence, its high concentration in immunosuppressed mice could trigger the observed production of SPM. The SPM that are usually connected to a better resolution of inflammation could be detrimental in the context of *Pneumocystis*-infected immunosuppressed mice because some of them (maresins and resolvins) have been shown to reduce a Th1 profile and promote regulatory T cells (51). At the opposite, PGE2 was increased in immunocompetent mice infected with *P. murina*, and could have a role in the infection control. In these conditions, effect of PGE2 could be in relation to the lipid switch that could limit inflammatory process by the production of specific SPM (Lipoxin A4, Resolvin D2) while allowing the elimination of the fungus.

RVD2 seems particularly interesting during *Pneumocystis* infections. Indeed, it was increased in infected immunocompetent mice, but also in mice receiving w6-enriched diet despite being produced from w3 fatty acid. Mice from this group had a better PCP evolution than the control group. Resolvin D2 is a potent inhibitor of PMN infiltration in the inflamed tissues (52,53) and PMN are generally associated with the disease severity in humans and in mice (54,55), as it has been in other diseases (56). Nevertheless, there is no direct proof of PMN toxicity against the lungs in the PCP context (55). Resolvin D2 also enhances the phagocytosis capacities of macrophages, at least for opsonized antigens, and reduces the anti-inflammatory IL-10 (52).

To our knowledge, this study is the first to evaluate SPM in the context of PCP. It has the advantage to observe globally different elements of *Pneumocystis* infection, including histopathology, lymphocyte phenotyping in the lungs and the spleen and cytokine measurement. The disease evolution is not only evaluated with the fungal load but also with respiratory functional tests, as the fungal clearance and the disease severity are not always evolving in the same direction. However, this study was mostly observational and mechanistic studies are required to better understand the observations we have made and to better determine the suggested connections between the lipids and the CD4 T helper. A functional study of macrophages is also required to connect T CD4 helper profiles and the actual macrophages polarization. In the same manner, further investigations are needed on B cells in the context of immunocompetent mice with lymphocyte phenotyping and potentially a quantification of produced antibodies, in order to better understand the role of B lymphocytes in the observed peribronchial structures evoking iBALT. Furthermore, the study on the modified FA intake has only been performed once yet and it should be repeated to confirm these results. Also, the difference in the PCP evolution between the three groups of diet were identified at 6 weeks p.i and a longer time of experiment would be interesting to confirm the observed effects of the w3 or w6 enriched diet over an extended period. As a murine model experiment, the results from this study could not be fully applicable to the infections in humans. Hence, LM concentrations during PCP infection should directly be studied in a clinical study.

In conclusion, the host immune response to *Pneumocystis* infection could be different according to the immune state of the infected-host. On the one side, immunocompetent mice responded with a large infiltration of B cells, gathered with T cells and macrophages in a structure suggesting iBALT. LM are poorly produced but the pro-inflammatory PGE2 eicosanoid could be useful to the development of an adequate response against *Pneumocystis*, perhaps by stimulating the production of specific SPM. This immune response allowed the mice to eliminate the fungus without any detectable symptoms. On the other side, immunosuppressed mice developed a delayed CD4 T cell activation with a differentiation of all types of T helper, with a Th1/Th2 profile more directed toward a Th2 response. At the same time, these mice developed a major T CD8 Tc1 response not observed in immunocompetent ones. A diet enriched in w6 FA was beneficial for both the fungus elimination and the respiratory function evolution. This diet was associated with a higher Th1/Th2 ratio and a reduced PGE2 pulmonary concentration at 6 weeks p.i Th1/Th2 ratio was negatively correlated to the fungal load which could be interpreted by a stronger macrophage activation in presence of a major Th1 response and therefore an improvement of the fungus elimination. As PGE2 was negatively correlated with Th1/Th2 ratio and with the fungal load, we can hypothesis that PGE2 could point the immune system towards Th2 response that would not constitute optimal condition for *Pneumocystis* lung clearance in

immunosuppressed mice. Hence, PGE2 positive effect in immunocompetent mice could be detrimental in immunosuppression conditions. The w3-enriched diet showed neither beneficial nor detrimental effect on *Pneumocystis* infection in comparison to mice with a classical diet, despite an increase of almost all SPM produced from w3 FA. Thus, the reduction of the inflammation during PCP could not have been better to improve the disease evolution. Paradoxally, a reinforcement of pro-inflammatory Th1 response in immunosuppressed mice could allow an improvement of the disease, possibly by enhancing the action of macrophages.

Acknowledgement: The authors gratefully acknowledge the cytometry technical platform of the Center for Pathophysiology Toulouse Purpan (CTP) for their advice concerning the flow cytometry experiments and the team of the animal care facility of the "Centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et de Ressources Expérimentales" (REFRE-Inserm UMS006), especially Romain Ecalard and Rachel Balouzat for their help and advice during our experiments.

1. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel)*. 18 oct 2017;3(4).
2. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev*. avr 2012;25(2):297-317.
3. Beck JM, Warnock ML, Curtis JL, Sniezek MJ, Arraj-Peffer SM, Kaltreider HB, et al. Inflammatory responses to *Pneumocystis carinii* in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol*. août 1991;5(2):186-97.
4. Hoving JC, Kolls JK. New advances in understanding the host immune response to *Pneumocystis*. *Curr Opin Microbiol*. déc 2017;40:65-71.
5. Otieno-Odhiambo P, Wasserman S, Hoving JC. The Contribution of Host Cells to *Pneumocystis* Immunity: An Update. *Pathogens*. 19 avr 2019;8(2).
6. Beck JM, Liggitt HD, Brunette EN, Fuchs HJ, Shellito JE, Debs RJ. Reduction in intensity of *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice by aerosol administration of gamma interferon. *Infect Immun*. nov 1991;59(11):3859-62.
7. Ruan S, Samuelson DR, Assouline B, Morre M, Shellito JE. Treatment with Interleukin-7 Restores Host Defense against *Pneumocystis* in CD4+ T-Lymphocyte-Depleted Mice. *Infect Immun*. 2016;84(1):108-19.
8. Bhagwat SP, Gigliotti F, Xu H, Wright TW. Contribution of T cell subsets to the pathophysiology of *Pneumocystis*-related immunorestitution disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. déc 2006;291(6):L1256-1266.
9. Eddens T, Elsegeiny W, Nelson MP, Horne W, Campfield BT, Steele C, et al. Eosinophils Contribute to Early Clearance of *Pneumocystis murina* Infection. *J Immunol*. 1 juill 2015;195(1):185-93.
10. Gigliotti F, Crow EL, Bhagwat SP, Wright TW. Sensitized CD8+ T cells fail to control organism burden but accelerate the onset of lung injury during *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infect Immun*. nov 2006;74(11):6310-6.
11. Lund FE, Hollifield M, Schuer K, Lines JL, Randall TD, Garvy BA. B cells are required for generation of protective effector and memory CD4 cells in response to *Pneumocystis* lung infection. *J Immunol*. 15 mai 2006;176(10):6147-54.
12. Sadik CD, Luster AD. Lipid-cytokine-chemokine cascades orchestrate leukocyte recruitment in inflammation. *J Leukoc Biol*. févr 2012;91(2):207-15.
13. Serhan CN. The resolution of inflammation: the devil in the flask and in the details. *FASEB J*. mai 2011;25(5):1441-8.
14. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Pro-Resolving lipid mediators and Mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity*. 20 mars 2014;40(3):315-27.
15. Feehan KT, Gilroy DW. Is Resolution the End of Inflammation? *Trends Mol Med*. 2019;25(3):198-214.

16. Russell CD, Schwarze J. The role of pro-resolution lipid mediators in infectious disease. *Immunology*. févr 2014;141(2):166-73.
17. Vassallo R, Standing JE, Limper AH. Isolated *Pneumocystis carinii* Cell Wall Glucan Provokes Lower Respiratory Tract Inflammatory Responses. *The Journal of Immunology*. 1 avr 2000;164(7):3755-63.
18. Le Faouder P, Baillif V, Spreadbury I, Motta J-P, Rousset P, Chêne G, et al. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1 août 2013;932:123-33.
19. Vestereng VH, Bishop LR, Hernandez B, Kutty G, Larsen HH, Kovacs JA. Quantitative real-time polymerase chain-reaction assay allows characterization of *Pneumocystis* infection in immunocompetent mice. *J Infect Dis*. 15 avr 2004;189(8):1540-4.
20. Eddens T, Elsegeiny W, de la Luz Garcia-Hernandez M, Castillo P, Trevejo-Nunez G, Serody K, et al. *Pneumocystis* driven inducible bronchus associated lymphoid tissue formation requires Th2 and Th17 immunity. *Cell Rep*. 28 mars 2017;18(13):3078-90.
21. Marin ND, Dunlap MD, Kaushal D, Khader SA. Friend or Foe: The Protective and Pathological Roles of Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue in Pulmonary Diseases. *J Immunol*. 01 2019;202(9):2519-26.
22. Kolls JK. An Emerging Role of B Cell Immunity in Susceptibility to *Pneumocystis* Pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2017;56(3):279-80.
23. Swain SD, Meissner NN, Harmsen AG. CD8 T cells modulate CD4 T-cell and eosinophil-mediated pulmonary pathology in *Pneumocystis* pneumonia in B-cell-deficient mice. *Am J Pathol*. févr 2006;168(2):466-75.
24. O'Donnell WJ, Pieciak W, Chertow GM, Sanabria J, Lahive KC. Clearance of *Pneumocystis carinii* cysts in acute *P. carinii* pneumonia: assessment by serial sputum induction. *Chest*. nov 1998;114(5):1264-8.
25. Martin-Garrido I, Carmona EM, Specks U, Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia in patients treated with rituximab. *Chest*. juill 2013;144(1):258-65.
26. Chamilos G, Lionakis MS, Kontoyiannis DP. Call for Action: Invasive Fungal Infections Associated With Ibrutinib and Other Small Molecule Kinase Inhibitors Targeting Immune Signaling Pathways. *Clin Infect Dis*. 06 2018;66(1):140-8.
27. Opata MM, Hollifield ML, Lund FE, Randall TD, Dunn R, Garvy BA, et al. B Lymphocytes Are Required during the Early Priming of CD4+ T Cells for Clearance of *Pneumocystis* Infection in Mice. *J Immunol*. 15 juill 2015;195(2):611-20.
28. Lund FE, Schuer K, Hollifield M, Randall TD, Garvy BA. Clearance of *Pneumocystis carinii* in mice is dependent on B cells but not on *P. carinii*-specific antibody. *J Immunol*. 1 août 2003;171(3):1423-30.
29. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity*. 16 oct 2014;41(4):529-42.

30. Goya S, Matsuoka H, Mori M, Morishita H, Kida H, Kobashi Y, et al. Sustained interleukin-6 signalling leads to the development of lymphoid organ-like structures in the lung. *J Pathol.* mai 2003;200(1):82-7.
31. Pelegrin P, Surprenant A. Dynamics of macrophage polarization reveal new mechanism to inhibit IL-1 β release through pyrophosphates. *EMBO J.* 22 juill 2009;28(14):2114-27.
32. Rong H-M, Li T, Zhang C, Wang D, Hu Y, Zhai K, et al. IL-10-producing B cells regulate Th1/Th17-cell immune responses in *Pneumocystis* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 01 2019;316(1):L291-301.
33. Swain SD, Meissner N, Han S, Harmsen A. *Pneumocystis* Infection in an Immunocompetent Host Can Promote Collateral Sensitization to Respiratory Antigens ∇ . *Infect Immun.* mai 2011;79(5):1905-14.
34. Hu Y, Wang D, Zhai K, Tong Z. Transcriptomic Analysis Reveals Significant B Lymphocyte Suppression in Corticosteroid-Treated Hosts with *Pneumocystis* Pneumonia. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2017;56(3):322-31.
35. Levine SJ, Larivée P, Logun C, Angus CW, Shelhamer JH. Corticosteroids differentially regulate secretion of IL-6, IL-8, and G-CSF by a human bronchial epithelial cell line. *Am J Physiol.* oct 1993;265(4 Pt 1):L360-368.
36. Zitnik RJ, Whiting NL, Elias JA. Glucocorticoid inhibition of interleukin-1-induced interleukin-6 production by human lung fibroblasts: evidence for transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol.* juin 1994;10(6):643-50.
37. Beck JM, Newbury RL, Palmer BE, Warnock ML, Byrd PK, Kaltreider HB. Role of CD8+ lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii* in mice. *J Lab Clin Med.* nov 1996;128(5):477-87.
38. McAllister F, Mc Allister F, Steele C, Zheng M, Young E, Shellito JE, et al. T cytotoxic-1 CD8+ T cells are effector cells against *Pneumocystis* in mice. *J Immunol.* 15 janv 2004;172(2):1132-8.
39. McAllister F, Steele C, Zheng M, Shellito JE, Kolls JK. In Vitro Effector Activity of *Pneumocystis murina*-Specific T-Cytotoxic-1 CD8+ T Cells: Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Infect Immun.* nov 2005;73(11):7450-7.
40. Nandakumar V, Hebrink D, Jenson P, Kottom T, Limper AH. Differential Macrophage Polarization from *Pneumocystis* in Immunocompetent and Immunosuppressed Hosts: Potential Adjunctive Therapy during Pneumonia. *Infect Immun.* 2017;85(3).
41. Castro M, Morgenthaler TI, Hoffman OA, Standing JE, Rohrbach MS, Limper AH. *Pneumocystis carinii* induces the release of arachidonic acid and its metabolites from alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* juill 1993;9(1):73-81.
42. Bafica A, Scanga CA, Serhan C, Machado F, White S, Sher A, et al. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J Clin Invest.* juin 2005;115(6):1601-6.
43. Aliberti J, Serhan C, Sher A. Parasite-induced lipoxin A4 is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J Exp Med.* 4 nov 2002;196(9):1253-62.

44. Anes E, Kühnel MP, Bos E, Moniz-Pereira J, Habermann A, Griffiths G. Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nat Cell Biol.* sept 2003;5(9):793-802.
45. Bonilla DL, Fan Y-Y, Chapkin RS, McMurray DN. Transgenic mice enriched in omega-3 fatty acids are more susceptible to pulmonary *tuberculosis*: impaired resistance to *tuberculosis* in fat-1 mice. *J Infect Dis.* 1 févr 2010;201(3):399-408.
46. Ruan S, McKinley L, Zheng M, Rudner X, D'Souza A, Kolls JK, et al. Interleukin-12 and host defense against murine *Pneumocystis* pneumonia. *Infect Immun.* mai 2008;76(5):2130-7.
47. Charles A Janeway J, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. Macrophage activation by armed CD4 TH1 cells. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease* 5th edition. 2001;
48. Li H, Edin ML, Gruzdev A, Cheng J, Bradbury JA, Graves JP, et al. Regulation of T helper cell subsets by cyclooxygenases and their metabolites. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* août 2013;104-105:74-83.
49. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol.* mai 2008;8(5):349-61.
50. Chan MM-Y, Moore AR. Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E2-mediated lipoxin A4 production. *J Immunol.* 1 juin 2010;184(11):6418-26.
51. Chiurchiù V, Leuti A, Dalli J, Jacobsson A, Battistini L, Maccarrone M, et al. Pro-resolving lipid mediators Resolvin D1, Resolvin D2 and Maresin 1 are critical in modulating T cell responses. *Sci Transl Med.* 24 août 2016;8(353):353ra111.
52. Spite M, Norling LV, Summers L, Yang R, Cooper D, Petasis NA, et al. Resolvin D2 is a potent regulator of leukocytes and controls microbial sepsis. *Nature.* 29 oct 2009;461(7268):1287-91.
53. Kurihara T, Jones CN, Yu Y-M, Fischman AJ, Watada S, Tompkins RG, et al. Resolvin D2 restores neutrophil directionality and improves survival after burns. *FASEB J.* juin 2013;27(6):2270-81.
54. Lee JY, Park HJ, Kim YK, Yu S, Chong YP, Kim S-H, et al. Cellular profiles of bronchoalveolar lavage fluid and their prognostic significance for non-HIV-infected patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Clin Microbiol.* avr 2015;53(4):1310-6.
55. Swain SD, Wright TW, Degel PM, Gigliotti F, Harmsen AG. Neither neutrophils nor reactive oxygen species contribute to tissue damage during *Pneumocystis* pneumonia in mice. *Infect Immun.* oct 2004;72(10):5722-32.
56. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* mars 2006;6(3):173-82.

SUPPLEMENTARY DATA :

Rat/Mouse - Maintenance autoclavable or γ -irradiated (fortified)

Complete feed for rats & mice

ssniff



Description

This diet has been designed for rats and mice and is suitable for long term experiments (e.g. chronic toxicity studies), because of the moderate energy density and the very low nitrosamine contents. The diet is vitamin and amino acid fortified to compensate for the nutrient losses during the sterilization process.

The diet is intended for ad libitum feeding. The animals should have free access to fresh water

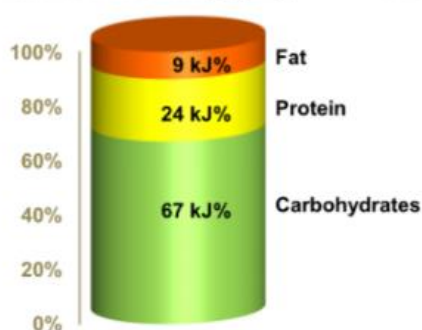
Gross Energy (GE) 16.2 MJ/kg

Metabolizable Energy (ME)¹⁾ 13.5 MJ/kg

¹⁾ = Physiological fuel value (Atwater);

correspond to 3230 kcal/kg

ME - pig = 12.8 MJ/kg



Crude Nutrients	[%]
Crude protein (N x 6.25)	19.0
Crude fat	3.3
Crude fibre	4.9
NDF	17.1
ADF	7.2
Crude ash	6.4
Starch	35.1
Sugar	4.9
N free extracts	54.4

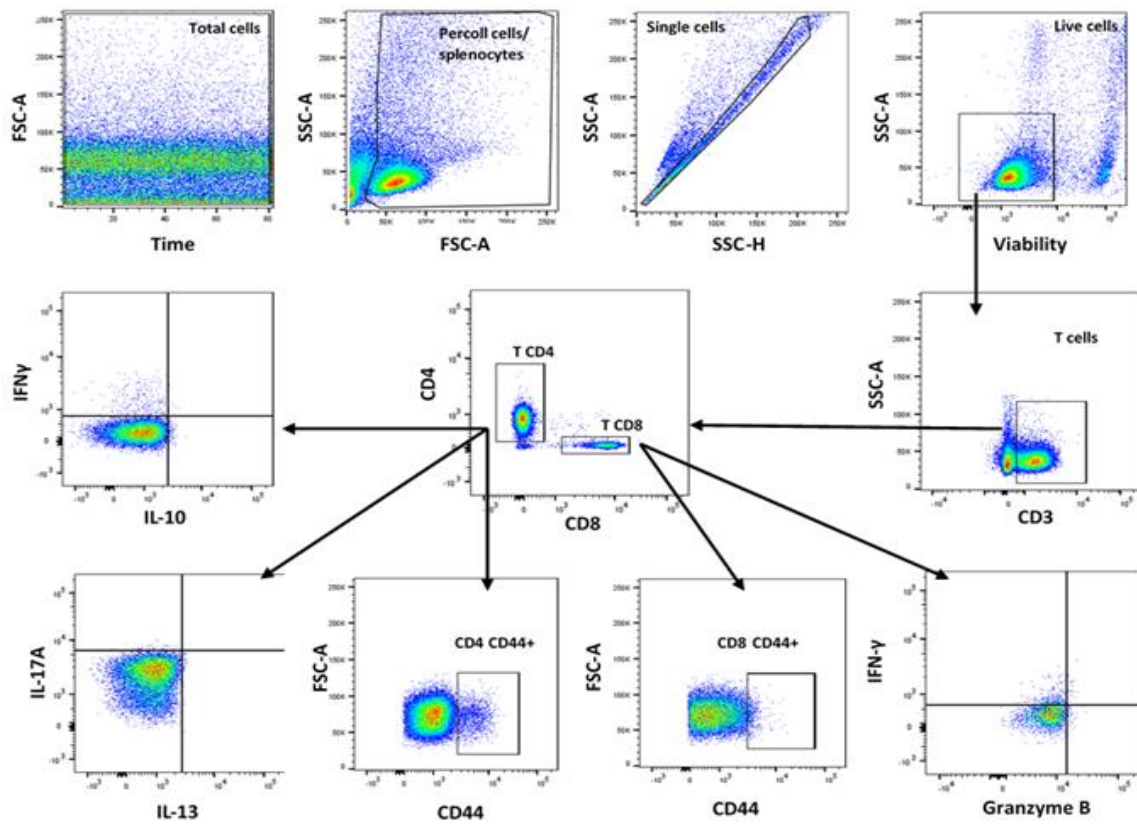
Minerals	[%]	Amino acids	[%]	Vitamins	per kg
Calcium	1.00	Lysine	1.10	Vitamin A	25,000 IU
Phosphorus	0.70	Methionine	0.38	Vitamin D ₃	1,500 IU
Ca / P	1.43 : 1	Cystine	0.35	Vitamin E	135 mg
Sodium	0.24	Met+Cys	0.73	Vitamin K (as MNB)	20 mg
Magnesium	0.22	Threonine	0.72	Thiamine (B ₁)	86 mg
Potassium	0.92	Tryptophan	0.25	Riboflavin (B ₂)	32 mg
		Arginine	1.19	Pyridoxine (B ₆)	31 mg
		Histidine	0.49	Cobalamin (B ₁₂)	150 µg
		Valine	0.92	Nicotinic acid	153 mg
		Isoleucine	0.79	Pantothenic acid	59 mg
		Leucine	1.39	Folic acid	10 mg
		Phenylalanine	0.89	Biotin	710 µg
		Phe+Tyr	1.50	Choline	1,370 mg
		Glycine	0.89		
		Glutamic acid	4.22	Trace elements	per kg
		Aspartic acid	1.84	Iron	186 mg
		Proline	1.31	Manganese	68 mg
		Serine	1.01	Zinc	91 mg
		Alanine	0.87	Copper	15 mg
				Iodine	2.1 mg
				Selenium	0.3 mg

Dietary composition

Wheat and wheat products, soybean products, barley, minerals, oat hulls, sugar beet pulp, vitamins & trace elements, L-lysine HCl, DL-methionine.

Supplementary figure 1 (S1): Chow composition of the classical maintenance diet.

The diet was supplemented with 1% EPA/DHA or 1% corn oil for the groups Pm(+) CTC(+) w3 and Pm(+) CTC(+) w6, respectively.



Supplementary figure 2 (S2): Gating strategies for the flow cytometry analysis of lymphocyte phenotypes.

A: panel 1 performed on both spleens and lungs, after an *ex-vivo* T cell stimulation. B: panel 2 performed only on spleen cells (due to a limited number of cells in the lungs), without prior *ex-vivo* stimulation.

Conclusions et perspectives de l'article 2

Ce travail chez la souris a permis de mettre en évidence l'existence de réponses lymphocytaires différentes au cours de l'infection à *Pneumocystis*, dépendantes du statut immunitaire de l'hôte. Chez les souris immunocompétentes, la réponse passe par la formation de structures iBALT riches en lymphocytes B et en lymphocytes CD4 Tfh, permettant un contrôle rapide de l'infection. Les souris immunodéprimées présentent, quant à elle, une activation T CD4 retardée avec un profil plutôt orienté Th2 et une très forte réponse T CD8 Tc1.

Par ailleurs, cette première évaluation des lipides pro-résolutifs de l'inflammation au cours d'une infection à *Pneumocystis* a révélé un intérêt des SPM chez les souris infectées par *P. murina*. Peu produits chez les souris immunocompétentes, les concentrations pulmonaires des SPMs étaient augmentées de manière globale chez les souris malades immunodéprimées au moment de l'apparition des symptômes respiratoires.

La PGE2 a montré un intérêt potentiel dans la physiopathologie de la PCP. Associée avec une mauvaise évolution de la maladie, elle était corrélée avec une réponse Th2 plus importante et avec une plus forte concentration de RVD2, celle-ci étant corrélée négativement avec la réponse Th1.

La modification des régimes lipidiques des souris atteintes de PCP a montré un effet bénéfique du régime enrichi en AG omega 6 sur l'évolution de la maladie et de la charge fongique. Il était associé à de plus faibles concentrations en PGE2 et en SPM et à une réponse Th1 plus forte. A l'inverse, le régime enrichi en omega 3 a induit de fortes concentrations de SPM dérivés des omega 3 et une diminution de l'inflammation pulmonaire qui n'amélioraient pas l'évolution de la PCP ni la clairance du champignon.

Forts des résultats de cette expérience sur le modèle murin, une confirmation chez l'humain nous a semblé nécessaire, pour affirmer le rôle de la PGE2 et des SPMs au cours de la PCP.

Dans cette perspective, une étude clinique prospective a été réalisée pour étudier les concentrations des médiateurs lipidiques de l'inflammation chez des patients atteints de PCP. Les concentrations plasmatiques de ces médiateurs au jour du diagnostic de PCP, ont été comparées en fonction 1) de la sévérité de leur atteinte respiratoire au jour du diagnostic, 2) de leur évolution clinique à 7 jours post-diagnostic. Le potentiel impact du régime lipidique sur la PCP a également été évalué par la mesure des concentrations d'acides gras chez ces mêmes patients.

Article 3 : Impact des médiateurs lipidiques pro-inflammatoires et pro-résolutifs sur la sévérité et l'évolution de la pneumocystose à *P. jirovecii*

Pro-inflammatory and pro-resolving lipid mediators impact on *Pneumocystis jirovecii* pneumonia severity and evolution in Human

Eléna Charpentier^{1, 2}, Catherine Marques², Sandie Menard², Guillaume Martin Blondel³, Camille Garnier³, Anne Huynh⁴, Nassim Kamar⁵, Arnaud Del Bello⁵, Stanislas Faguer⁵, Alain Didier⁶, Elise Noel-Savina⁶, Aurélie Le Borgne Krams⁶, Sandrine Pontier⁶, Jean Ruiz⁷, Muriel Picard⁷, Sihem Bouharaoua⁷, Laure Crognier⁸, Karen Delavigne⁹, Gérald Chêne¹⁰, Boualem Sendid¹¹, Sylvie Caspar¹², Marc Dubourdeau¹⁰, Nicolas Blanchard², Antoine Berry^{1, 2}, Xavier Iriart^{1, 2}.

1: Department of Parasitology-Myecology, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

2: Center for Pathophysiology Toulouse Purpan (CPTP), Inserm, CNRS, University of Toulouse III, UPS, Toulouse, France

3: Department of Tropical and Infectious diseases, Toulouse University Hospital, Toulouse, France
Ambiotis SAS, Toulouse, France

4: Department of Oncohematology, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

5: Department of Nephrology and Transplant, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

6: Department of Pneumology, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

7: Oncohematology Intensive Care unit, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

8: General intensive Care unit, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

9: Internal Medicine Department, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

10: Ambiotis SAS, Toulouse, France

11: Department of Parasitology-Myecology, Lille University Hospital, Lille, France

12: Department of clinical Biochemistry, Toulouse University Hospital, Toulouse, France

ABSTRACT

Pneumocystis pneumonia (PCP) is a severe opportunistic disease in which the host inflammation is decisive. Despite, the major role of lipid mediators (LM) in the inflammation, pro-inflammatory and pro-resolving lipid mediators (SPM) have been poorly evaluated in PCP. A prospective clinical study was conducted to evaluate their impact on the severity and evolution of PCP.

From October 2018 to March 2020, 34 patients diagnosed with PCP were included in the study. Twenty-three (67%) were classified in the moderate PCP group (SpO₂/FiO₂ >300) while the 11 others had a severe PCP. Among the 25 subjects followed-up at day 7 post-diagnosis, 7 (28%) had an unfavorable evolution, based on the SpO₂/FiO₂ evolution.

There were few differences in LM when comparing patients according to their severity at the day of the diagnosis [lower protectin D1 in the severe PCP group (p=0.01)]. However, SPM were globally higher in the group of subjects with unfavorable evolution. That was associated with a higher prostaglandin E2 (PGE2) plasma concentration (p=0.04) and a higher peripheral blood Th2 CD4 T cell profile (p=0.006). A lower proportion of erythrocyte omega 6 fatty acid (FA), and a higher concentration of omega 9 FA and omega 3 FA were also found in patients evolving unfavorably (p=0.02, p=0.03 and p=0.004, respectively). High PGE2 plasma concentration was correlated with an unfavorable evolution of PCP, a reduced plasma IFN γ concentration, low omega 6 FA proportion and high omega 9 FA concentration.

In conclusion, while increased level of certain SPM (notably protectin D1) could have a beneficial effect on PCP severity, high overall concentrations of SPM are also associated with a worse evolution of the disease, possibly by reducing CD4 Th1 profile. PGE2 could have a key role in PCP inflammation mechanism through SPM production activation and Th1/Th2 direct or indirect reduction. LM can consequently constitute new molecules of interest for PCP pathophysiology understanding and as clinical markers or potential therapeutic targets.

INTRODUCTION

Pneumocystis pneumonia (PCP) is an opportunistic fungal disease which remains one of the most frequent AIDS-defining illness and a major threat for HIV-negative patients with solid organ transplant, blood cancer or auto-immune diseases (1,2). Currently, there is not any known *Pneumocystis jirovecii* genetic mutation linked with a resistance to curative therapies. However, despite an adapted treatment initiation, PCP mortality remains as high as 20 to 30% with worse prognoses for HIV-negative patients (2–4). The host immune response to *Pneumocystis* infection is at the heart of the disease pathophysiology and the lung lesions observed during PCP are mostly related to an excessive pulmonary inflammation (5,6). Numerous studies have attempted to identify the implication of the different inflammatory elements in the fungus clearance and in the lungs degradation. These studies focused mainly on lymphocyte populations and mostly on CD4 T lymphocytes which are key cells in the defense against the fungus. Nevertheless, none of the CD4 T cell subpopulation (Th1, Th2, Th17) could be specifically connected to the disease severity (5,7). Inflammation is a natural and complex process which implies many different components, among which leukocytes, platelets, epithelial cells but also lipid mediators (LM) and soluble protein mediators (8). Over the last decades, significant progress has been achieved in the understanding of inflammation development and resolution. In particular, the paradigm of passive inflammation resolution that was believed to happen when the initial inflammation-triggering stimulus disappeared has been challenged. Currently, inflammation resolution is considered as an active process which requires specific signals, in addition to the « danger » stimuli control (9). These instructions are, at least partially, given by the pro-resolving mediators (SPM) that correspond to the families of polyunsaturated fatty acids (PUFA) lipoxins, resolvins, protectins and maresins (10). SPMs are defined by their pro-resolution function, among which polymorphonuclear neutrophils (PMN) infiltration inhibition, apoptotic cell elimination stimulation and macrophages phagocytosis enhancement (11). Without these LMs, the inflammation ending is compromised and the inflammation could therefore evolve towards a chronic status (9). To the best of our knowledge, SPMs role in PCP have not yet been evaluated but their impact in other infections has already been reported (12). Hence, the depletion of lipoxin during *Influenza* infection in mice is associated with a greater virulence of the disease (13). The addition of resolvin during an *E. coli* peritonitis infection has improved the survival and bacteria clearance, allowing the reduction of necessary antibiotics doses (14).

In this context and considering the critical implication of inflammation during PCP, this study aimed to observe and report for the first time the SPMs plasma concentration in patients suffering from PCP. SPMs plasma levels at the day of the diagnosis were compared in patients according to their initial PCP severity presentation at the diagnosis and according to their PCP evolution seven days post diagnosis.

In order to better understand the impact of LMs on the inflammation occurring during PCP, T lymphocyte responses and cytokines production were also measured in the peripheral blood of included patients. Moreover, because LMs are produced from essential fatty acids (FA) that are obtained from the food only (15), patients' FA compositions of red blood cells and plasma phospholipids were evaluated in parallel to the LMs.

MATERIEL AND METHODS

Ethics statement

The included subjects were informed about the protocol by the investigating physicians and were given an information notice. Because the study was observational, an oral consent was sufficient and was given by the patient to the investigating physicians after a 2-hours-minimum reflection time. The protocol and other relevant documentation were approved by the French Ethic Committee (CPP Grenoble) on June 26th 2020. This trial is registered with EU Clinical Trials Register, number ID-RCB 2018-A01062-53.

Patients

From October 2018 to March 2020, adult patients (over 18 years of age) with a positive *Pneumocystis jirovecii* qPCR in Toulouse University Hospital were prospectively included in the study. Six units of Toulouse University Hospital participated to the inclusions: Infectious disease department, Onco-Hematology department, Pneumology department, Transplantation department, general intensive care unit (ICU) and oncology ICU. There was no exclusion in relation to the cause of immunosuppression. The DNA extraction and consecutive qPCR for *P. jirovecii* diagnosis were performed on sputum, tracheal-aspirations or broncho-alveolar lavages (BAL) as previously described by Fillaux *et al* 2008 (16). In order to evaluate the inflammatory parameters as early as possible after PCP diagnosis, subjects were included the day when *P. jirovecii* qPCR was positive and PCP diagnosis was confirmed *a posteriori*, with both biological and clinical arguments.

First, in order to exclude *P. jirovecii* colonization, PCP diagnosis required a high fungal load [qPCR cycle threshold (Cq) <27.5 cycles for BAL or Cq <24 cycles for sputum and tracheal aspirations] (threshold defined in a previous work (17)) or otherwise a high plasma β -D glucans (BDG) concentration (>100 pg/mL) in the absence of other invasive fungal diseases (for instance aspergillosis or candidemia) (18). BDG measurement was performed by the Department of Parasitology and Mycology of Lille University Hospital, using Fungitell assay (Associates of Cape Cod, East Falmouth, MA). Subsequently, PCP

diagnosis was confirmed by clinical arguments, which were the presence of PCP-compatible symptoms (i.e dyspnea, fever and/or cough) and/or CP-compatible imaging (i.e ground glass opacities or anomalies of interstitial lung tissue) in addition to the initiation of a curative anti-*Pneumocystis* therapy.

Study design

Patients were included the day of the diagnosis (D0) and there was a follow-up at seven days post diagnosis (D7). Clinical status and respiratory functions were evaluated at D0 and D7 by investigating physicians. EDTA blood samples (BD Vacutainer® 7 ml, BD Biosciences, San Jose, California) were obtained at D0 and D7 for the specific assays of the protocol. The patients' care was never modified for the protocol progress. Patients that returned home or that were transferred outside Toulouse University Hospital before the end of the protocol were considered as "lost to follow-up". Case report forms were filled out by investigating physicians and clinical research associates.

At D0, several analyzes were performed from the peripheral blood. SPM, cytokines and β -D-glucanes were measured in the plasma while SPM-precursors fatty acids were measured both on the erythrocytes and in the plasma, and a lymphocyte phenotyping was done on the peripheral blood mononuclear cells (PMBCs).

The severity and the evolution of the disease were evaluated with the ratio of oxygen saturation (SpO₂) and the fraction of inspired oxygen (FiO₂), as previously described (19).

The subjects with SpO₂/FiO₂ <300 at D0 were included in the group of "severe PCP", for this threshold was previously determined for acute lung injury (20,21). At the opposite, subjects with SpO₂/FiO₂ >300 at D0 were included in the group of "moderate PCP". To determine if a patient had rather a favorable or unfavorable PCP evolution, the following " Δ SpO₂/FiO₂" ratio was calculated for each patient that was followed-up at D7 : Δ SpO₂/FiO₂ = [(SpO₂/FiO₂ at D0)-(SpO₂/FiO₂ at D7)]/(SpO₂/FiO₂ at D0)]. Hence, if the subjects' Δ SpO₂/FiO₂ ratio was lower than -10%, they were classified in the group of "unfavorable evolution". Conversely, if the subjects' Δ SpO₂/FiO₂ ratio was higher than +10%, they were classified in the group of "favorable evolution". For patients with -10%< Δ SpO₂/FiO₂<+10%, subjects were included in the group of unfavorable evolution if the patient died during the study or if he had a "severe PCP" at D0 that remained severe at D7 (SpO₂/FiO₂ at D0 and D7 <300). Patients with -10%< Δ SpO₂/FiO₂<+10% and "moderate PCP" at D0 and D7 (SpO₂/FiO₂ at D0 and D7 >300) were not analyzed in this part of the study.

Isolation of the blood components

Two EDTA blood tubes of 7 mL were received for each included subject at D0. They were immediately processed and stored to avoid a degradation of the SPM and fatty acids. The pooled blood was centrifuged at 350g for 10 minutes to separate plasma, buffy coat layer and erythrocytes. The buffy coat layer was collected for lymphocyte phenotyping. It was diluted with phosphate buffered saline 1X (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri) in a 1:1 ratio (vol/vol) and deposited on a lymphocyte separation medium (Ficoll-Human density 1.077g/ml - PAN Biotech, Germany) before a centrifugation at 350g for 20 min. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected at the interface and were resuspended in a cryopreservation medium containing fetal calf serum (Gibco, Carlsbad, California) and dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich, St-Louis, Missouri) in a ratio of 9:1 (vol/vol) and, by step, frozen in -80°C freezer, then in liquid nitrogen for storage until the immunophenotyping analysis.

Lipid Mediators measurement

Two mL of plasma previously obtained from EDTA blood tubes were centrifuged a second time for 15 minutes at 1500g and rapidly mixed with ice-cold methanol (1:1 v/v) that contained a lipid standard (Ambiotis SAS, Toulouse, France) in order to evaluate a potential effect of storage time on SPM degradation. The mix was stored at -80°C until the lipids extraction and measurement. SPMs measurement was performed by Ambiotis SAS. The extraction protocol and analysis of bioactive lipids were performed as described in Le Faouder, Baillif *et al* (22) and adapted by the Ambiotis SAS (Toulouse, France) standard operating procedures. Samples were taken to solid phase extraction in the presence of the deuterated internal standards, and lipid mediators (LM) were eluted in MeOH. After solvent evaporation, samples were dissolved in MeOH/H₂O and injected into an Exion-LCAD U-HPLC system (Sciex) equipped with a Kinetex C18 column (2.1 mm*100 mm, 1.8 μm) (Phenomenex). LM were eluted with a binary gradient of water/formic acid 0.1% and MeOH/formic acid 0.1% and taken to MS/MS analysis on a Q-TRAP 6500+ instrument (Sciex). LM were identified based on matching of retention time to authentic standards. Calibration curves were obtained using authentic LM mixtures, and quantification was carried out based on peak areas from multiple reaction monitoring (MRM) transitions (22). The following LM were measured : 6-keto-prostaglandinF1 (6K-PGF1), Thromboxane B2 (TXB2), prostaglandine E2 (PGE2), Lipoxin B4 (LXB4), leukotriene B4 (LTB4), 15(S)-Hydroxyeicosatetraenoic acid [15(S)-HETE], 12(S)- Hydroxyeicosatetraenoic acid [12-HETE], 5(S)-Hydroxyeicosatetraenoic acid [5(S)-HETE], Resolvin D1 (RVD1), Resolvin D2 (RVD2), Resolvin D3 (RVD3), Resolvin D4 (RVD4), Resolvin D5 (RVD5), Maresin 2 (MAR2), Maresin 1 (MAR1), Protectin DX (PDX), Protectin D1 (PD1), 17(S)-hydroxy Docosahexaenoic acid [17(S)-HDOHE], 14(S)-hydroxy

Docosahexaenoic acid [14(S)-HDOHE], 18(R)-hydroxyeicosapentaenoic acid [18(R)-HEPE], Resolvin E1 (RVE1) and Resolvin E2 (RVE2).

Fatty acids measurement

In order to evaluate the metabolism precursors of SPM, phospholipid-derived fatty acids (PLFAs) were measured in plasma and in red blood cells. Red blood cells (RBC) were separated from plasma by centrifugation at 3000 g for 15 min at 4 °C. 250µL of plasma or RBC were added to 1.5 mL of methanol additioned with 10 mg/L of butylhydroxytoluène (BHT) in a glass tube. The internal standard 1-2 dinonadecanoyl-sn glycerol-3 phosphatidyl choline (Interchim, Montluçon, France) was added and the tube was filled with nitrogen gas and stored at -20°C until the experiment. The fatty acids measurement was performed by the clinical Biochemistry Department of Toulouse University Hospital. Lipids were extracted according to the method of Folch (23) and phospholipid fraction was isolated by thin layer chromatography silica gel 60 (E. Merck, Darmstadt, Germany) using acetone/diethylether (1vol/3vol) as the mobile phase. FA methyl esters (FAME) were generated by transmethylation (1 hour, 60°C, acetyl chloride 1vol/ methanol 20vol). Separation and quantitation (expressed as mg/L or percentage of total FAs) of FAMEs was achieved on a GC 2030 (Shimadzu, Champs sur Marne, France) with flame ionization detection as previously described (24).

Fifteen membrane phospholipid FA were measured: palmitic acid (C16:0), stearic acid (C18:0), linolenic acid (C18:2, w6), dihomo-gamma linolenic (C20:3, w6), Arachidonic acid (AA, C20:4, w6), docosate-traenoic acid (C22:4, w6), docosapentaenoic acid (C22:5, w6); ALA (C18:3, w3), EPA (C20:5, w3), docosapentaenoic acid (C22:5, w3), DHA (C22:6, w3), oleic acid (C18:1, w9), eicosatrienoic acid (C20:3, w9), eicosatrienoic acid (C20:3, w7), octadecenoic acid (C18 :1, w7) and palmitoleic acid (C16:1, w7). Sum of w6 and w3 FA were calculated from these measured FA.

Leukocyte numeration and lymphocytes subpopulations

Lymphocytes subpopulations were determined immunophenotypically with a panel containing 14 antibodies from BD Biosciences (San Jose, California): CD3-APCH7, CD4-BV786, CD8α-BV711, CD25-BV421, CD45RA-PE-Cy7, CD56-BV605, CD127-AF647, CD183-BB700, CD194-BV650, CD196-PE CF594, CD197-BB515, CD279-BV510 (PD-1), Foxp3-PE and a viability marker (FVS-APC R700). Clones of all antibodies are detailed in supplementary data (Table SI). PBMCs were thawed in a water bath at 37°C and immediately re-cultured in RPMI Medium 1640 1X medium (Gibco, Carlsbad, California) with 10% human serum (obtained from French Blood Establishment-EFS, Toulouse, France), 1mM sodium pyruvate (Sigma, St-Louis, Missouri) and 2mM L-glutamine (Invitrogen, Carlsbad, California). A total of

500 000 cells were transferred to a 96-V-bottom-plate (or the whole PBMC aliquot when there was an insufficient number of cells). After a saturation of all non-specific sites in the presence of pure human serum, cells were stained with the viability marker, followed by the cell surface staining (all antibodies detailed above except the anti-FoxP3) and finally the intracellular FoxP3 staining after the cells fixation and permeabilization with the Transcription Factor Buffer (BD Biosciences, San Jose, California). Cells were immediately acquired using LSR-Fortessa flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, California). Data were analyzed using Flowjo software (version 10). The gating strategy is detailed in supplemental data (Figure S1). Auto-fluorescence controls and fluorescence minus one controls (FMO) were performed to improve the analysis of poorly expressed markers and the experiments were standardized to guaranty reproducible and comparable results from different experiments. In order to avoid uncertain gating, lymphocyte populations were not analyzed if acquired lymphocyte number was lower than 5000 cells.

Cytokines

Cytokines concentration of IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-15, IL-17, IFN γ , TNF α and total TGF β 1 were measured in the plasma using a LegendPlex kit Custom 13 Plex and n°740450 (Biolegend, San Diego, California), in accordance to the manufacturer's instructions.

Statistical analyzes

Statistical analyzes of patients' characteristics and inflammatory parameters were performed using GraphPad Prism version 5.0 software (GraphPad, San Diego, CA). A chi2 test or a Fisher's exact test (when Chi2 conditions were unfulfilled) was used to compare the clinical data. A non-parametric Mann-Whitney test was used to compare the distribution of SPMs concentrations, PLFAs levels, lymphocytes subpopulations counts and cytokines concentrations between the different groups of interest. A non-parametric Spearman's test was performed for the correlation tests. Results were considered significant if p-value was lower than 0.05. Significant results are underlined in the tables.

RESULTS

Subjects' inclusions

From October 2018 to March 2020, there were 90 adult patients with a positive *Pneumocystis* qPCR in the six departments of Toulouse University Hospital that included subjects in this study. An oral

consent for the inclusion in the study was obtained from 65 of these patients. Afterwards, PCP diagnosis was confirmed for 34 subjects according to criteria in the "Materiel and Method" section (Figure 1). In these 34 patients with confirmed PCP diagnosis, 11 had a ratio $SpO_2/FiO_2 < 300$ and were therefore classified in the group of "severe PCP" while the 23 other patients were gathered in the group of "moderate PCP". Nine of the 34 patients with confirmed PCP were no longer hospitalized at Toulouse University Hospital seven days post diagnosis and were thus considered "lost to follow up". From the 25 subjects with PCP remaining hospitalized at day 7 post diagnosis, 7 had an unfavorable evolution. Five had a $\Delta SpO_2/FiO_2 < -10\%$ and 2 patients still had a severe PCP at D7 post diagnosis without significant evolution. The 18 other patients had a $\Delta SpO_2/FiO_2 > 10\%$ and were classified in the group of PCP "favorable evolution". None of the 25 patients died during the time of the study. The inclusion process is represented in details in figure 1.

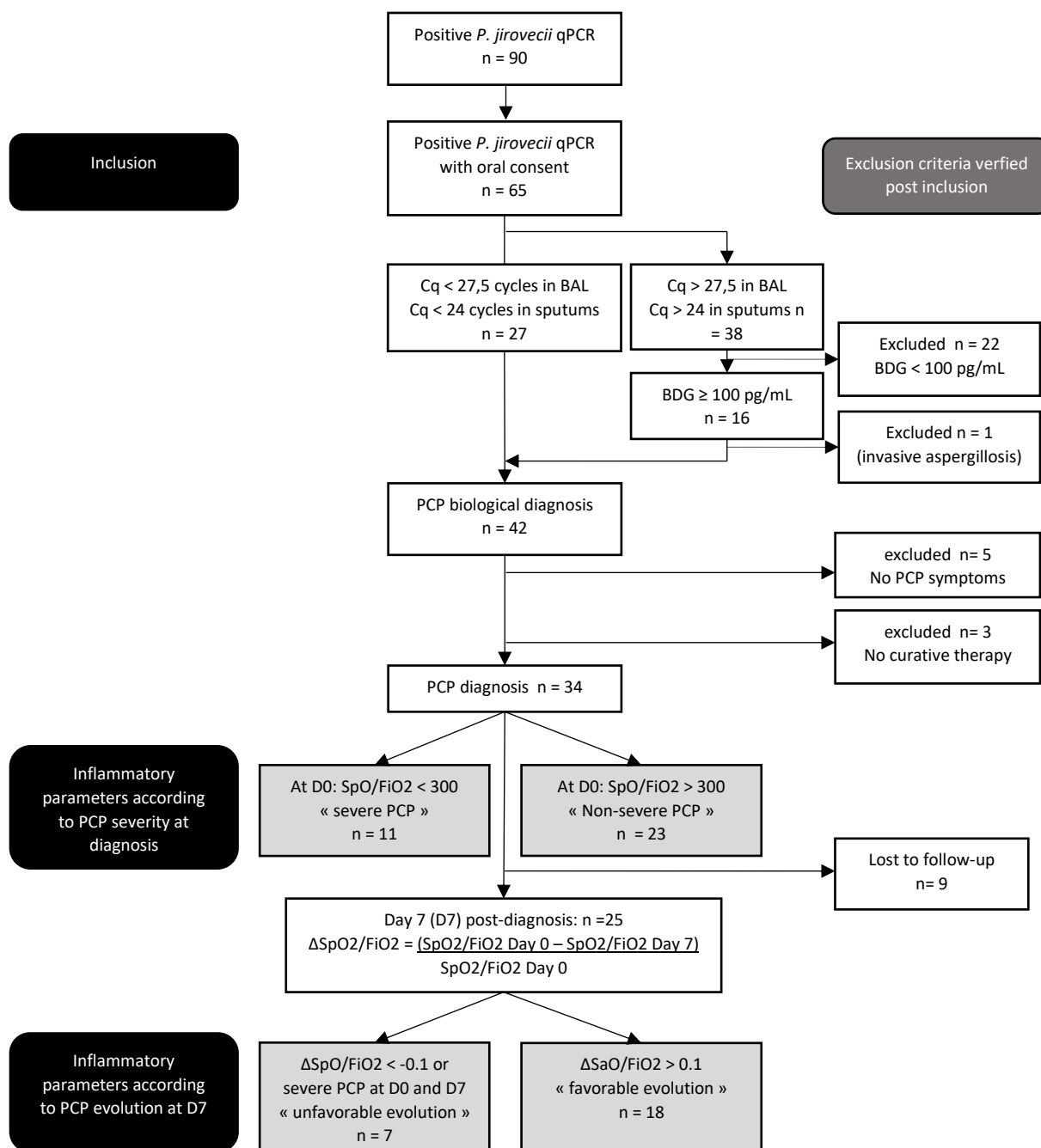


Figure 1: Flowchart of patient inclusions and patients' classification in studied groups

PCP: *Pneumocystis jirovecii* pneumonia; BDG: β -D glucans; Cq: qPCR cycle threshold, BAL: Broncho-alveolar lavages.

Subjects' clinical and paraclinical characteristics

The patients' characteristic according to PCP evolution are gathered in the Table I. The subjects had a media age of 66 years and 61 years for the group of favorable and unfavorable evolution, respectively. There was no significant difference between the two groups regarding the sex ratio, the immunosuppression condition although there was no patient with AIDS in the group of unfavorable evolution. The fungal load, evaluated with lung qPCR Cq or with BDG concentration in blood, was not different between the two groups. Interestingly, 2 subjects (11%) of the group evolving favorably and 1 subject (14%) of the group evolving badly were receiving anti-*Pneumocystis* prophylaxis at the time of PCP diagnosis. Concerning potential confounding factors for the interpretation of inflammatory parameters, there was no significant difference in the anti-inflammatory drugs received (corticosteroids or Aspirin). No "Non-steroidal Anti Inflammatory drugs" (NSAID) other than aspirin were reported. However, the consumption of these drugs can be difficult to evaluate for investigating physician considering some of them are over-the-counter medicines. Clinical symptoms, imaging presentation and respiratory function evaluated with SpO₂/FiO₂ were comparable between the two groups at the day of the diagnosis. As expected, SpO₂/FiO₂ at D7 post diagnosis was lowering the group with unfavorable evolution, meaning a greater impairment of lung function in this group.

	PCP severity at D0			PCP evolution at D7		
	Moderate PCP	Severe PCP	p-value	Favorable evolution	Unfavorable evolution	p-value
n patients	23	11		18	7	
Median age (years) [min; max]	65 [22; 86]	68 [53; 79]	0,46	66 [35; 72]	61 [48; 86]	0,38
Sex ratio (M/F)	2,3 (16/7)	0,8 (5/6)	0,26	1,6 (11/7)	1,3 (4/3)	1.0
Immunosuppression condition						
Solid organ transplant	7 (30%)	2 (18%)	0,68	5 (28%)	1 (14%)	0.64
Solid cancer	3 (13%)	2 (18%)	1	1 (6%)	2 (29%)	0,18
Blood cancer	7 (30%)	2 (18%)	0,68	4 (22%)	3 (43%)	0,36
Inflammatory disease	2 (9%)	4 (36%)	0.07	3 (17%)	1 (14%)	1.0
HIV infection	4 (17%)	1 (9%)	1	4 (22%)	0 (0%)	0,29
Others	0 (0%)	0 (0%)	-	1* (6%)	0 (0%)	1.0
Corticosteroid therapy 2 month prior to PCP	17 (74%)	8 (73%)	1	11 (61%)	6 (86%)	0,36
Adjuvant corticosteroids in PCP treatment	5 (22%) ^a	3 (27%) ^b	0.75	6 (33%) ^a	0 (0%)	0.14
Aspirin received 2 month prior to PCP	5 (22%)	4 (36%)	0,43	3 (17%)	2 (29%)	0.6
Anti-Pj prophylaxis before PCP	1 (4%)	2 (18%)	0,13	2 (11%)	1 (14%)	1.0
qPCR Cq	23,7 [16,0; 32,4]	24,3 [18,8; 29,8]	0,97	23,5 [16,03; 32,4]	23,0 [19,8; 33,5]	0,61
β-D glucanes (pg/mL)	401 [18; 5000]	409 [71;5000]	0,7	405 [71; 5000]	271 [18; 2213]	0,38
SpO2/FiO2 at day 0	376 [300; 471]	209 [100; 294]	<u>0,0001</u>	313 [143; 408]	343 [100; 471]	0,32
SpO2/FiO2 at day 7	411 [193; 462] **	372 [100; 457] ***	0,61	443 [258; 467]	229 [100; 332]	<u>0,001</u>
Positive CMV PCR (blood and/or BAL)	2 (9%)	3 (27%)	0,3	4 (22%)	1 (14%)	1.0
Pulmonary co-infections	16 (70%)	5 (28%)	0,18	11 (61%)	5 (71%)	1.0
Bacteria	13 (57%)	4 (36%)	0,46	10 (56%)	4 (57%)	1.0
Viruses	3 (13%)	1 (9%)	1	2 (11%)	0 (0%)	1.0
Fungi	1 (4%)	1 (9%)	1	0 (0%)	2(29%)	0,07
Non-pulmonary co-infections	10 (43%)	4 (36%)	1	5 (28%)	4 (57%)	0,2
Bacteria	5 (22%)	1 (9%)	0,64	1 (45%)	1 (14%)	0,49
Viruses	5 (22%)	3 (27%)	1	4 (22%)	3 (43%)	0,36
Fungi	0 (0%)	0 (0%)	1	0 (0%)	0 (0%)	1.0
Clinical signs at D0						
Fever	14 (61%)	8 (73%)	0,7	14 (78%)	4 (57%)	0,36
Cough	18 (78%)	7 (63%)	0,43	14 (78%)	4 (57%)	0,36
Dyspnea	15 (65%)	11 (100%)	<u>0,03</u>	14 (78%)	4 (57%)	0,36
Respiratory distress (SpO2/FiO2<300)	0 (0%)	11 (100%)	<0.0001	8 (44%)	2 (29%)	0,66
Imaging						
Interstitial syndrom	21 (91%)	8 (73%)	0.30	18 (100%)	5 (71%)	0.07
Lung nodule	5 (22%)	3 (27%)	1	6 (33%)	2 (29%)	1.0
Pleural effusion	4 (17%)	3 (27%)	0,66	3 (17%)	2 (29%)	0,6
Intensive care unit admission	5 (22%)	4 (36%)	0,43	4 (22%)	4 (57%)	0,16
Mechanical ventilation/ High-flow O2 at D0	1 (4%)	6 (55%)	<u>0,002</u>	4 (22%)	3 (43%)	0,36
2 months-mortality	4 (17%)	1 (9%)	0.48	2 (11%)	3 (43%)	0.11

Table 1. Subjects clinical and paraclinical characteristics.

*: prolonged corticosteroid therapy for a cirrhosis; **: calculated on 16 patients; ***: calculated on 10 patients; ^a: 3 HIV-positive patients; ^b: 1 HIV-positive patient; NSAID: Non-steroidal Anti Inflammatory drugs; ARDS: Acute Respiratory Distress Syndrom; Pj: *Pneumocystis jirovecii*

Statistics of subjects' characteristics were performed with Chi2 test or Fisher test if Chi2 test conditions were not met. SpO2/FiO2 ratio, β-D glucanes and qPCR Cq were compared with Mann Whitney's test. P-values were considered significant if lower than 0.05. Significant p-values are underlined in the table.

LMs measurement

Pro-inflammatory and pro-resolving lipid mediators were measured in the plasma of the included subjects. Results are detailed in Table II. The comparison between patients with severe or moderate PCP revealed a difference in Protectin D1 concentration that was significantly lower in the group of severe PCP compared to the patients with moderate PCP ($p=0.01$). Pro-inflammatory LM and other SPMs were not significantly different.

Concerning the comparison of LM according to PCP evolution, there was a significantly higher concentration of prostaglandin E2 (PGE2) in the group with unfavorable evolution ($p=0.04$). Other proinflammatory LMs (6-keto prostaglandin F1 and thromboxane B2) were not significantly different. SPMs analysis revealed a significantly higher concentration of Resolvin D4 (RVD4) in the group of unfavorable evolution. Resolvin D1 (RVD1) and resolvin E1 (RVE1) concentrations also tended to be higher in the patients with unfavorable evolution compared to the patient evolving favorably ($p=0.08$ and $p=0.09$, respectively). The intermediate metabolites 12(S)-HETE and 14(S)-HDODE (produced by the 12 lipoxigenase (12-LOX) from arachidonic acid and DHA, respectively) had significantly higher concentrations in the group of unfavorable PCP evolution ($p=0,01$ and $p=0,03$, respectively). Furthermore, there was a global tendency of higher SPM in the patients evolving unfavorably with non-significant elevated concentration of protectin D1, resolvin E2 in comparison to the group of favorable evolution ($p=0.15$ and $p=0.17$, respectively). Hence, Protectin D1 was significantly lower in patients with severe PCP but tended to be higher in patients with unfavorable evolution.

	moderate PCP at D0 Median [IQ range] n =23	Severe PCP at D0 Median [IQ range] n = 11	pvalue	Favorable evolution Median [IQ range] n = 18	Unfavorable evolution Median [IQ range] n = 7	pvalue
6-keto prostaglandin F1	42,4 [0,0; 366,6]	26,0 [0,0; 92,3]	0,46	23,2 [0,0; 92,7]	77,41 [44,0; 135,5]	0,19
Thromboxane B2	504,8 [266,7; 1024]	456,0 [254,8; 1093,0]	0,74	330 [217; 1045]	847 [600,0; 1483,0]	0,21
Prostaglandin E2	15,7 [10,6; 42,7]	12,8 [9,1; 23,5]	0,25	13,3 [9,6; 21,6]	23,9 [12,6; 46,1]	<u>0,04</u>
Lipoxin B4	15,0 [4,8; 28,9]	13,6 [0,5; 25,5]	0,49	12,1 [0,38; 20,5]	25,5 [11,8; 28,0]	0,15
Lipoxin A4	1,3 [0,5; 2,2]	0,8 [0,6; 1,8]	0,68	0,9 [0,6; 1,7]	1,8 [0,8; 2,0]	0,41
Leukotrien B4	0,2 [0,0; 0,7]	0,3 [0,1; 0,6]	0,43	0,23 [0,0; 0,6]	0,4 [0,0; 0,7]	0,81
15(S)-HETE	594,1 [268,0; 975,1]	612,1 [414,5 ; 1805,0]	0,40	537,0 [258,7; 1123,0]	688,6 [500,7; 1376,0]	0,35
12(S)-HETE	195,2 [146,4; 380,1]	200,5 [100,2 ; 518,6]	0,87	150,2 [102,5; 208,2]	275,0 [206,6; 518,6]	<u>0,01</u>
5(S)-HETE	110,9 [69,5; 168,1]	97,4 [74,6; 137,4]	0,76	94,4 [74,1 ; 153,1]	110,6 [68,9; 380,9]	0,69
Protectin D X	0,5 [0,1; 0,8]	0,3 [0,1; 0,7]	0,29	0,75 [0,31; 1,39]	1,04 [0,4; 3,6]	0,49
Protectin D 1	1,7 [0,5; 3,0]	0,7 [0,3; 0,9]	<u>0,01</u>	0,77 [0,44; 1,06]	1,88 [0,81; 6,35]	0,15
17(S)-HDOHE	384,4 [221,0; 765,4]	637,3 [269,0; 1047,0]	0,37	370,6 [196,3; 740,0]	543,7 [312,1; 1055]	0,24
14(S)-HDOHE	216,2 [86,5; 408,4]	167,6 [111,6; 323,0]	0,87	123,5 [88,5; 238,8]	323,0 [160,4; 595,9]	<u>0,03</u>
Resolvin D1	0,9 [0,4; 1,4]	0,5 [0,3; 1,4]	0,39	0,50 [0,25; 0,87]	1,43 [0,34; 2,60]	0,08
Resolvin D2	0,0 [0,0; 1,0]	0,0 [0,0; 1,8]	0,83	0,10 [0,00; 1,63]	0,00 [0,00; 1,05]	0,59
Resolvin D3	0,3 [0,0; 0,9]	0,2 [0,1; 0,5]	0,71	0,34 [0,01; 0,90]	0,47 [0,01; 1,25]	0,90
Resolvin D4	0,0 [0,0; 0,3]	0,0 [0,0; 0,4]	0,63	0,00 [0,00; 0,27]	0,44 [0,00; 1,80]	<u>0,04</u>
Resolvin D5	2,8 [1,6; 4,6]	1,7 [0,6; 2,7]	0,07	2,60 [1,70; 4,06]	1,57 [0,85; 4,15]	0,65
7-S maresin 1	3,7 [0,5; 6,4]	2,3 [1,2; 4,5]	0,54	3,5 [1,4; 7,4]	1,6 [1,0; 3,7]	0,28
Maresin 2	2,0 [0,9; 3,3]	1,5 [0,8; 2,8]	0,56	1,3 [0,8; 2,2]	2,8 [1,5; 3,5]	0,15
18(R)-HEPE	115,9 [69,7; 184,8]	114,4 [61,3; 204,0]	0,96	114,0 [60,9; 139,2]	161,7 [105,7; 335,3]	0,19
Resolvin E1	0,7 [0,2; 1,1]	0,4 [0,0; 1,2]	0,42	0,52 [0,10; 0,75]	0,9 [0,38; 6,6]	0,09
Resolvin E2	0,5 [0,3; 1,2]	0,4 [0,3; 0,7]	0,25	0,40 [0,20; 0,71]	0,87 [0,29; 1,44]	0,17

Table II: Medians and interquartile ranges of lipid mediators plasma concentrations at D0, according to PCP severity and according to PCP evolution at D7.

Statistics were performed with Mann Whitney's test. P-values were considered significant if lower than 0.05. Significant P-values are underlined in the table. PCP: *Pneumocystis jirovecii* pneumonia; 12(S) HETE: 12(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid; 15(S) HETE: 15(S)-hydroxyeicosatetraenoic acid; 17(S) HDOHE: 17(S) hydroxy docosahexaenoic acid, 14(S) HDOHE: 214(S) hydroxy docosahexaenoic acid, 18(R) HEPE: 18R-hydroxyeicosapentaenoic acid.

T helper profiles and plasma cytokines concentration

The proportions of peripheral blood lymphocyte CD4 T cells Th1 (CD4 CXCR3+ CCR4- CCR6-), Th2 (CD4+ CCR4+ CXCR3- CCR6-), Th17 (CD4+ CCR4+ CXCR3- CCR6+), regulatory T cells (Treg, CD4+ CD127 high CD25 low Fox P3+) and also the proportion of cytotoxic Tc1 CD8 (CD8+ CXCR3+) were evaluated using flow cytometry. For the severe PCP, moderate PCP, unfavorable evolution and unfavorable evolution groups, there were 9, 17, 6 and 15 subjects' lymphocyte profile analyzed, respectively (n lymphocyte analyzed > 5000 cells). There was no significant difference in T lymphocyte profile between the groups of severe PCP and moderate PCP (data not shown). The comparison of T cells profiles according to PCP evolution revealed significant differences between the two studied groups (Figure 2). Indeed, the

patients with unfavorable evolution had significantly more Th2 CD4 T cells than the group of favorable PCP evolution ($p=0.006$). Although there was no significant difference for Th1 population, the Th1/Th2 ratio was lower in the group of patients with unfavorable evolution ($p=0.04$). Th17 cells, Treg and CD8 Tc1 cells were not significantly different according to PCP evolution.

The T lymphocyte profiles evaluation was complemented by an analysis of multiple cytokines plasma concentrations using Legendplex technology. Between the groups of severe PCP and moderate PCP, there was no significant difference for blood cytokines concentration related with T lymphocyte profile (IL-13, IL-4, IL-2, IFN γ , IL-17, IL-9, IL-10, TGF β , IL-7 and IL-15). There was no significant difference for the blood concentration of cytokine associated with macrophages activation (TNF α , IL-1 β) according to the severity at D0. Nevertheless, the potent PMN chemoattractant IL-8 was significantly higher at D0 in the group of severe PCP than in the group of moderate PCP with median values of 47.0 and 18.8, respectively ($p=0.047$). IL-8 plasma concentration was also significantly correlated with SpO2/FiO2 at D0 ($\rho = -0.5$, $p=0.046$). Thus, the higher IL-8 plasma concentration were, the more severe the PCP was. Concerning the PCP evolution, there was no significant difference between the two groups for all the cytokines concentration (data not shown).

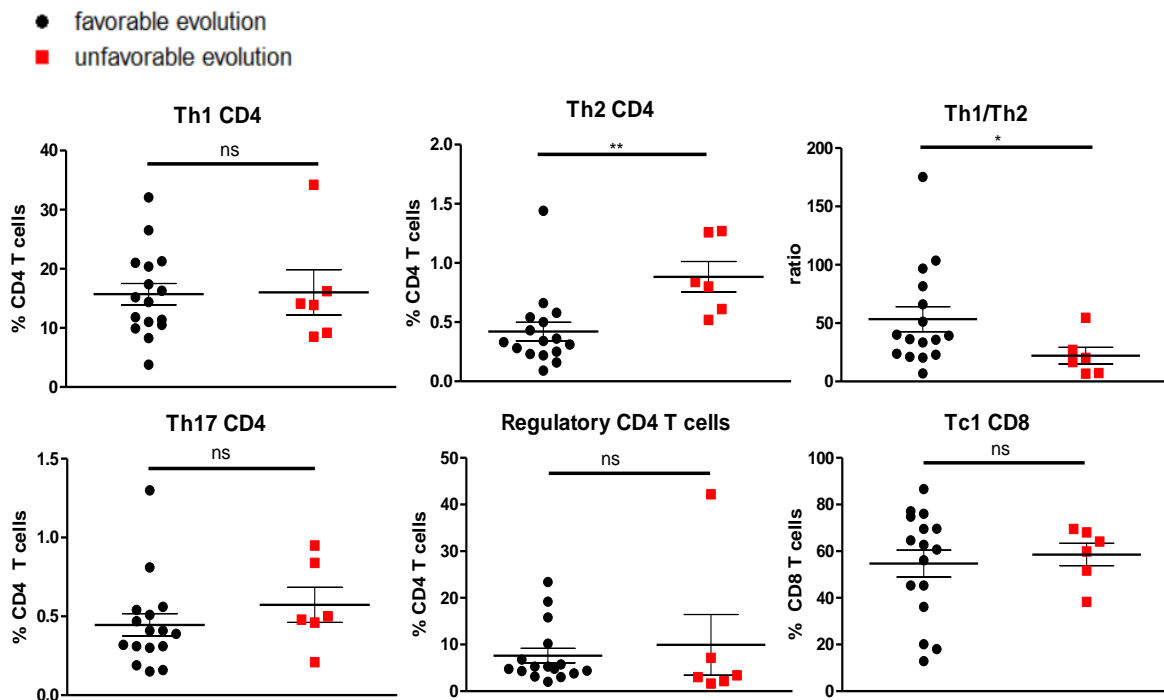


Figure 2: Peripheral blood T lymphocyte profiles observed in flow cytometry.

*: p-value < 0.05; **: p-value < 0.01; ns: not significant

n=15 patients for favorable evolution and n=6 patients for unfavorable (n lymphocyte analyzed > 5000 cells).

Fatty acids measurement

LMs are polyunsaturated fatty acids (FA) from the families of omega 3 and omega 6 fatty acids, thus their precursors are essential fatty acids that are obtained only from the food. Hence, LM fatty acids precursors were evaluated, as well as the global quantity of FA, by measuring the erythrocytes and plasma phospholipids-derived fatty acids (PLFA). Erythrocyte PLFAs are a reflect of a longer-term dietary exposure while plasma PLFAs are considered as an "instant" evaluation of FA distribution (25). Results are detailed in Table III.

The FA comparison between the groups of moderate and severe PCP showed a significantly higher omega 6 concentration in erythrocytes for patients with severe PCP ($p=0.04$). There was no significant difference in the plasma composition of PLFA.

When comparing PLFAs concentration depending on the evolution of PCP, the erythrocyte FA quantity was significantly higher in patients evolving badly at 7 days post-diagnosis, due to both a higher concentration of saturated and unsaturated FA ($p=0.02$ and $p=0.04$, respectively) in comparison to patients with a favorable evolution. PLFA erythrocyte distribution was also different in the two groups with a lower proportion of omega 6 FA ($p=0.02$), a higher omega 3 concentration ($p=0.03$) and a higher concentration and proportion of omega 9 FA ($p=0.004$ and $p=0.02$, respectively) in patients with an unfavorable evolution. Omega-6 proportion was also lower ($p=0.02$), as was arachidonic acid (ARA) proportion ($p=0.04$) while oleic acid concentration was significantly higher ($p=0.04$) in the plasma of patients with unfavorable evolution.

	PCP severity at D0			PCP evolution at D7		
	Moderate PCP at D0 Median [IQ range]	Severe PCP at D0 Median [IQ range]	pvalue	Favorable evolution Median [IQ range]	Unfavorable evolution Median [IQ range]	pvalue
	n=23	n = 11		n = 18	n = 7	
Erythrocytes PLFAs						
quantity of FA (mg/L)	1386 [1229; 1450]	1455 [1305; 1565]	0,06	1371 [1258; 1489]	1565 [1448; 1631]	<u>0,02</u>
saturated FA (mg/L)	565 [515; 612]	617 [559; 655]	0,10	559 [528; 618]	655 [607; 691]	<u>0,02</u>
unsaturated FA (mg/L)	812 [722; 858]	857 [767; 926]	0,06	821 [728; 868]	910 [840; 932]	<u>0,04</u>
ARA (C20: 4 n-6) (mg/L)	220 [202; 246]	238 [228; 242]	0,20	225 [200; 248]	242 [224; 247]	0,38
ARA (C20: 4 n-6) (% total FA)	15,6 [14,7; 18,0]	15,8 [14,6; 16,3]	0,94	16,1 [14,5; 18,2]	15,1 [14,7; 15,5]	0,29
DHA (C22:6 n-3) (mg/L)	66 [56; 80]	69 [61; 76]	0,63	59 [54; 75]	80 [68; 86]	0,06
DHA (C22:6 n-3) (% total FA)	4,8 [4,1; 5,8]	4,5 [4,2; 5,3]	0,71	4,5 [3,9; 5,1]	5,4 [4,4; 5,8]	0,19
EPA (C20:5 n-3) (mg/L)	10,5 [7,7; 12,6]	11,6 [10,1; 13,2]	0,45	10,4 [7,8; 14,1]	11,8 [11,2; 15,4]	0,11
EPA (C20:5 n-3) (% total FA)	0,8 [0,6; 1,0]	0,8 [0,7; 1,1]	0,80	0,8 [0,5; 1,1]	0,8 [0,7; 1,0]	0,25
oleic acid (C20: 1 n-9) (mg/L)	215 [198; 234]	221 [190; 260]	0,42	208 [194; 222]	260 [226; 267]	<u>0,004</u>
oleic acid (C20: 1 n-9) (% total FA)	15,8 [15,2; 16,4]	15,6 [14,6; 16,3]	0,42	15,5 [15,0; 15,9]	16,4 [15,6; 16,7]	<u>0,02</u>
Sum of n-6 FA (mg/L)	442 [405; 465]	476 [426; 548]	<u>0,04</u>	450 [403; 513]	465 [454; 500]	0,45
Sum of n-6 FA (% total FA)	32,5 [31,0; 33,5]	32 [31,4; 33,4]	0,91	32,4 [31,7; 35,0]	31,4 [30,4; 31,9]	<u>0,02</u>
Sum of n-3 FA (mg/L)	106 [94; 128]	116 [106; 133]	0,30	105 [93; 123]	128 [114; 143]	<u>0,03</u>
Sum of n-3 FA (% total FA)	7,7 [6,9; 8,9]	7,5 [7,2; 8,3]	0,85	7,4 [6,8; 8,4]	8,7 [7,3; 10,0]	0,17
n-6 FA / n-3 FA	4,0 [3,5; 4,9]	4,2 [3,8; 3,5]	0,80	4,3 [3,8; 4,9]	3,5 [3,1; 4,4]	0,12
Index omega 3 (EPA + DHA)	5,5 [4,8; 6,7]	5,4 [5,1; 6,3]	0,70	5,3 [4,7; 5,9]	6,3 [5,2; 7,3]	0,20
Plasma PLFAs						
quantity of FA (mg/L)	912 [726; 1211]	894 [746; 1298]	0,77	870 [750; 1271]	1085 [912; 1298]	0,26
saturated FA (mg/L)	436 [350; 538]	414 [387; 568]	0,73	393 [348; 585]	500 [417; 568]	0,21
unsaturated FA (mg/L)	497 [373; 670]	505 [391; 733]	0,80	477 [405; 689]	604 [497; 733]	0,38
ARA (C20: 4 n-6) (mg/L)	87 [69; 110]	100 [90; 127]	0,62	95 [75; 129]	86 [60; 110]	0,57
ARA (C20: 4 n-6) (% total FA)	10,4 [7,5; 11,4]	9,3 [7,0; 11,4]	0,81	10,4 [8,1; 11,8]	7,5 [6,9; 10,4]	<u>0,04</u>
DHA (C22:6 n-3) (mg/L)	30 [20; 36]	31 [22; 41]	0,69	27,0 [19; 35]	31 [18; 37]	0,53
DHA (C22:6 n-3) (% total FA)	2,9 [2,4; 3,9]	3,0 [2,2; 3,7]	0,84	2,8 [2,2; 3,5]	2,6 [2,1; 3,8]	0,93
EPA (C20:5 n-3) (mg/L)	6,7 [4,1; 9,7]	8,7 [4,6; 15,5]	0,52	6,6 [3,2; 13,2]	9,0 [5,7; 16,2]	0,24
EPA (C20:5 n-3) (%total FA)	0,7 [0,5; 1,0]	0,8 [0,6; 1,3]	0,46	0,8 [0,4; 1,0]	1,0 [0,6; 1,3]	0,36
oleic acid (C20: 1 n-9) (mg/L)	108 [82; 161]	120 [85; 188]	0,66	101 [84; 160]	161 [120; 211]	<u>0,04</u>
oleic acid (C20: 1 n-9) (% total FA)	12,0 [10,5; 14,5]	12,2 [11,2; 13,5]	0,70	12,3 [10,6; 13,8]	15,1 [12,0; 16,2]	0,11
Sum of n-6 FA (mg/L)	322 [246; 412]	317 [270; 401]	0,88	312 [260; 427]	321 [275; 401]	0,79
Sum of n-6 FA (% total FA)	34,5 [32,8; 35,6]	32,3 [30,8; 36,2]	0,45	34,3 [32,2; 36,3]	30,8 [26,0; 34,5]	<u>0,02</u>
Sum of n-3 FA (mg/L)	44 [32; 56]	47 [40; 67]	0,69	41 [29; 61]	54 [32; 94]	0,29
Sum of n-3 FA (% total FA)	4,8 [3,6; 6,0]	4,7 [4,6; 5,5]	0,80	4,7 [3,5; 5,7]	4,7 [3,5; 6,6]	0,93
n-6 FA / n-3 FA	7,0 [5,7; 9,9]	6,6 [6,5; 7,2]	0,74	7,0 [6,4; 9,0]	6,6 [4,7; 8,4]	0,36

Table III: Erythrocyte and plasma phospholipid-derivatives Fatty acids comparison according to PCP severity and PCP evolution.

Statistics were performed with Mann Whitney's test. P-values were considered significant if lower than 0.05. Significant p-values are underlined in the table. PCP: *Pneumocystis pneumonia*, FA: Fatty Acid, ARA: Arachidonic acid, DHA: docosahexaenoic acid, EPA: eicosapentaenoic acid.

Correlations

In order to better understand the association between the different parameters that were measured in this study, Spearman's non-parametric correlation tests were performed (Figure 3). They were done on the 25 patients from the groups of PCP favorable and unfavorable evolution. First, correlation tests showed that the eicosanoid PGE2 was negatively correlated with the evolution of the disease ($p=0.04$, $\rho=-0.41$), confirming the previous results. Although there was no significant correlation between Th1/Th2 and PCP evolution, IFN γ plasma concentration and PCP evolution were significantly positively correlated (Figure 3A). Moreover, the lungs fungal load, estimated by the Cq of *Pneumocystis* qPCR was not correlated with Th2 or Th1/Th2 ratio (data not shown) but a high CD8 Tc1 proportion was significantly associated with a high PCR Cq, thus a low fungal burden (Figure 3A).

In a second time, we focused on the eicosanoid PGE2 and its relation to the other inflammatory parameters evaluated in this study (Figure 3B). PGE2 has been reported to reduce Th1 response and to increase the Th2 profile (26). In this study, PGE2 was not significantly correlated to Th1/Th2 ratio but it was negatively correlated to IFN γ ($p=0.02$). Because resolvins have also been associated with a reduction of Th1 response (27,28), their correlation with Th1/Th2 ratio was evaluated. Only RVD1 had a significant negative correlation with Th1/Th2 ratio ($p=0.04$). RVD1 was also positively correlated with PGE2 plasma concentration ($p=0.005$).

Finally, correlation between PGE2 and the FA precursors of LM were evaluated. The plasma concentration of omega 6-derived PGE2 was significantly negatively correlated with omega 6 FA proportion in the plasma ($p=0.02$), but neither with the omega 6 FA proportion in the erythrocyte nor with ARA plasma proportion (data not shown). However, omega 6 FA plasma proportion and erythrocyte proportion were positively correlated ($p=0.004$). PGE2 was also associated with oleic acid (C20: 1 n-9) plasma proportion ($p=0.04$) and with oleic acid erythrocyte concentration ($p=0.04$) but was not associated with omega 3 FA erythrocyte concentration (data not shown).

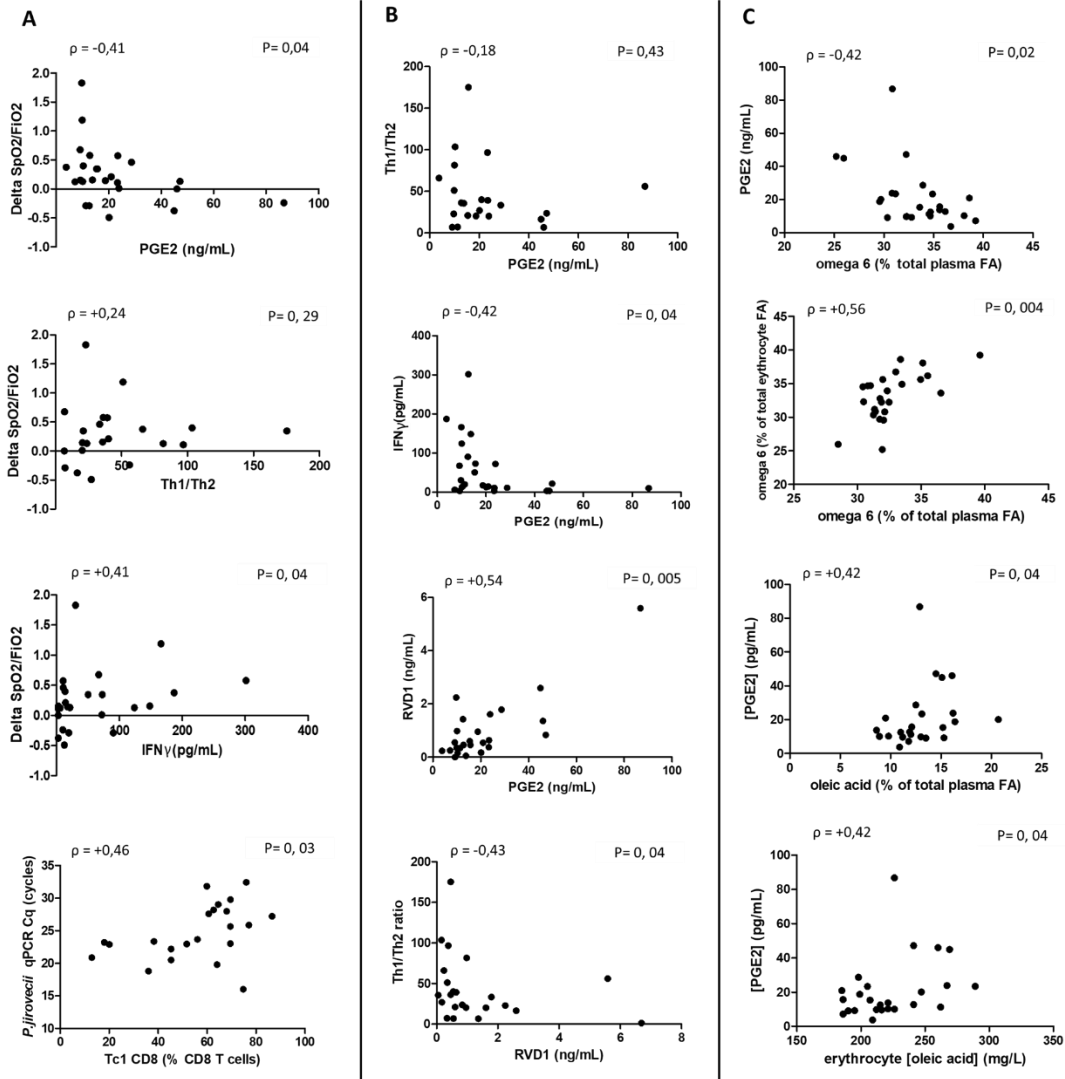


Figure 3: Correlation between the inflammatory parameters, metabolism precursors, PCP evolution and fungal load.

A: Correlation between PCP evolution and inflammatory parameters. **B:** Correlation between PGE₂ and RVD1 on lymphocyte profile; **C:** Correlation between PGE₂ and the FA concentrations and proportions.

PGE₂: Prostaglandin E₂; RVD1: Resolvin D1; Cq: qPCR cycle threshold; SpO₂: oxygen saturation, FiO₂: fraction of inspired oxygen.

Correlation tests were performed on the 25 patients evaluated for the evolution of the disease (groups of favorable evolution and unfavorable evolution). Correlation was evaluated statistically with the non-parametric Spearman's test. Spearman's coefficients (ρ) are reported on the top-left corner of the figures. P-values are indicated at the top right corner of each graphs and were considered significant if <0.05 .

DISCUSSION :

PCP is a fungal infectious disease in which the host inflammatory response is decisive for the disease evolution. The lung lesions observed during the disease have been clearly associated with inflammation (6,29) and lymphocyte responses have been widely studied, demonstrating the key role of CD4 T cell in the disease (30,31). However, there are only a few studies looking at the pro-inflammatory eicosanoids implication in PCP infections (32,33), and no published report have yet evaluated SPMs concentration during PCP, to our knowledge. Hence, this prospective clinical study aimed to evaluate the role of LMs, including SPMs, in PCP. In this prospective study, LMs plasma concentrations were compared in the included subjects depending on their PCP severity at D0 and depending on the disease evolution at D7.

First, the comparison of SPM according to the PCP severity at D0 revealed a significantly higher concentration of the DHA-derived protectin D1 in patients with "moderate PCP". This SPM has already been found protective in different lungs affections. Indeed, the addition of protectin D1 in mice infected with *Influenza* virus increased the mice survival (7) and patients with severe asthma had an impaired production of protectin D1 when compared to healthy subjects (34). Protectin D1 can induce a reduction of PMN transmigration and infiltration in inflamed tissue, as reported by Serhan *et al* (35). Thus, the protective effect of protectin D1 in PCP could be related, at least partially, to a reduction of PMN chemotaxis, as suggested by the significantly lower IL-8 concentration observed in the "moderate PCP" group. High levels of IL-8 have previously been associated with PCP severity in HIV-infected patients (36). We did not evaluate the PMN infiltration in the lungs, nevertheless previous clinical studies have reported a correlation between the PCP severity and PMN concentration in the lungs (37,38). The quantification of PLFAs in erythrocyte revealed a significant increase in omega 6 FA concentration for the patients with severe PCP. A higher concentration of omega-6 has been related to a higher pro-inflammatory response. However, there was no association with a higher production of w6-derived pro-inflammatory eicosanoids, prostaglandins or in the potent PMN chemoattractant leukotrien B4, that was comparable between the patients with severe or moderate PCP. There was no difference in T lymphocytes profile, either in flow cytometry or in the measured cytokines.

Secondly, the comparison of LMs according to PCP evolution paradoxically revealed global higher concentrations of SPMs in patients evolving unfavorably, with a significant higher plasma concentration of resolvin D4 and the 12-lipoxygenase metabolites 12(S)-HETE and 14(S)-HDOH. Hence, the protective effect of the protectin D1 on PCP severity at D0 was not confirmed when focusing on the disease evolution at D7. In previous studies, SPMs have been shown to improve some bacterial, viral, fungal and parasitic infections, for instance in *Escherichia coli* peritonitis (14) or in *Trypanosoma*

cruzi infection (39), with both an increased clearance of the pathogens and an improved clinical evolution. But SPMs have also been reported to have a detrimental role in other infections. For instance, Bafica *et al* found that the depletion of lipoxins in mice infected with *Mycobacterium tuberculosis* or *M. ovis* lead to a better control of the bacterial burden and an improved mice survival (40). In *Toxoplasma gondii* infection, a study showed that lipoxins reduced the mortality but also reduced *T. gondii* elimination (41). This detrimental effect of SPM in the context of PCP could be related to a SPM-induced modification of the adaptative immune response. In this study, the group of subjects with an unfavorable PCP evolution had a significantly higher Th2 response and lower Th1/Th2 ratio. Moreover, IFN γ plasma concentration was found positively correlated with PCP evolution. These data support a favorable role of Th1 response during PCP and a more deleterious implication of Th2 profile. Some SPM, among which resolvins D, have been shown to reduce the Th1 and Th17 response and promote the Th2 response (27,28). Although RVD4 was not significantly found correlated with Th1 or Th2 response, RVD1 that tended to be higher in the group of unfavorable evolution ($p=0.08$) was negatively correlated with Th1/Th2 ratio. Previous studies on *Pneumocystis* murine model have shown a better clearance of the fungus when Th1 response was enhanced by a IFN γ or IL-12 supplementation (42,43). In this study, a high CD8 Tc1 proportion was significantly associated with a low fungal burden. Interestingly, although an important number of SPMs tended to be higher in patients evolving badly, the significant differences concerned RVD4, 12(S)-HETE and 14(S)-HDOHE that are all metabolized by the 12-lipoxygenase, expressed by platelets, megacaryocytes and leukocytes. The 12-lipoxygenase expression has been reported to be stimulated by hypoxia (44) but there was no significant increase in 12-LOX metabolites in patients with severe PCP in this study. A Th2 response (stat6 expression) has been shown to upregulate *in vitro* the 12-LOX expression in murine macrophages and human airway epithelial cells (45,46). We can hypothesize that the Th2 context associated with PCP unfavorable evolution, might upregulate the 12-LOX expression, leading to a higher concentration of its metabolite in patients with unfavorable evolution. Nevertheless, Th2 profile has also a strong upregulation effect on 15-LOX (45,46), whose metabolites (15-HETE) were not upregulated in our study. Polymorphisms of the 12-LOX coding gene (*alox12*) have been reported in Humans and were connected with various diseases (such as toxoplasmosis (47), colon cancer (48) or essential hypertension (49)). These polymorphisms were associated with high 12(S)-HETE production (49) but no connection with SPM concentrations have been made yet, to the best of our knowledge.

PGE2 concentration has also been found higher in patients evolving badly at D7. PGE2 is a pro-inflammatory eicosanoid yet it also has an inflammation regulatory effect that is related to a COX-2 feedback loop. Indeed, PGE2 produced by COX-2 has been shown to enhance the expression of IL-10, reduce the expression of TNF α and other pro-inflammatory mediators, and promote the differentiation of macrophages towards an alternatively-activated, pro-resolving M2 phenotype, thus

inhibiting COX-2 pro-inflammatory effects (50,51). In this study, Th1/Th2 ratio was not found significantly correlated with PGE2 plasma concentration. However, PGE2 was significantly negatively correlated with IFN γ plasma concentration. Furthermore, PGE2 has been identified as a component triggering the LM class-switch from prostaglandin synthesis toward SPM synthesis, by increasing the 15-lipoxygenase activity over COX activity (52–54). Thus, its higher concentration in patients evolving unfavorably could explain a higher concentration of SPM. Indeed, resolvin D1 concentration was significantly positively correlated with PGE2 concentration.

Concerning PGE2 and SPMs FA precursors, patients with unfavorable evolution had lower omega 6 FA proportions whereas their omega 3 FA and oleic acid concentrations were higher in comparison to the group of favorable evolution. Once again, the disease severity at D0 and the bad evolution of the disease at D7 showed different profiles, considering that omega-6 FA erythrocyte concentration was higher in case of severe PCP. One possible interpretation of the low omega 6 proportion in patients with a bad evolution could be an omega 6 FA consumption related to the inflammation. Indeed omega 6-derived PGE2 concentration was negatively correlated with the omega 6 proportion in the plasma. However, the absolute quantity of omega 6 was not significantly different either in the plasma or in the erythrocyte regarding PCP evolution. Also, this hypothesis would imply that the inflammation has been lasting for days or weeks to explain the low erythrocyte omega 6 proportion.

A second hypothesis to explain the low omega 6 FA observed in case of unfavorable evolution could be a difference of FA dietary intake. Patients evolving unfavorably would have a more important intake of omega 3 and oleic acid (C20: 1 n-9), leading to a lowered omega 6 FA proportion. In this case, the higher PGE2 concentration found in patients with lower omega 6 FA proportion would imply either a negative feedback of omega 6 FA on PGE2 production or an impact of omega 3 or omega 9 FA on PGE2 production. Indeed, oleic acid erythrocyte concentration was significantly higher in the group of unfavorable evolution and was significantly correlated with PGE2 concentration. Oleic acid has been reported to increase *in vitro* the endometrial cells production of PGE2 of a pregnant ovine and to cause a more important production of PGE2 after a lipopolysaccharide stimulation (55). Oleic acid-induced increase of PGE2 was confirmed *in vivo* in rats, although an omega 6-enriched diet triggered even more PGE2 production (56). This effect of oleic acid on PGE2 concentration could be related to the oleic acid capacity to bind PPAR receptor. Indeed, stimulated PPAR receptors have been described to increase COX-2 expression in leukocytes and thus PGE2 production (56–58). Interestingly, the higher erythrocyte concentration of omega 3 FA found in case of bad evolution was not correlated to PGE2 concentration. Little is known about an oleic acid enriched diet impact on inflammation and infections but it has been reported as protective in the context of colitis inflammation (59) with a mechanism involving PPAR γ receptors (60).

This prospective clinical study is the first one that describes and evaluates the SPM during PCP. Although the number of included subjects is limited, they all had a well-defined PCP diagnosis based on two biological tools (qPCR Cq and BDG) and on a PCP compatible clinic presentation. Moreover, the prospective characteristic of the study allowed to correctly collect the fundamental clinical and biological data such as the potential confounding factor of anti-inflammatory therapies. It can be noted that there was no significant difference concerning the number of patients receiving anti-inflammatory therapy (corticosteroids or Aspirin), either in the two groups focusing on PCP severity or on the evolution at D7. However, a limit of this study is the evaluation of LM in the plasma of included subjects and not in the site of inflammation, i.e. the lungs. Even though more invasive for the patient, an evaluation of LMs in the site of infection would be of interest, but a strictly standardized BAL protocol should be applied in order to be able to compare concentrations in BAL. Nonetheless the plasma concentration of LMs have the advantage of being easily obtained and in a reproducible way. These two advantages are interesting for a potential role of severity marker or prognosis marker in PCP. Also, PCP evolution was evaluated 7 days after the diagnosis for its generally a sufficient delay to observe an improvement of the disease under adequate therapy (61) and it was not extended to a longer time in order to avoid an important number of "lost to follow-up". Nevertheless, it would be of interest to have a longer follow-up of the patients' evolution, with longitudinal sampling to monitor the concentrations of LMs during the disease.

In conclusion, this observational prospective study showed for the first time that LMs, including SPMs, have a role in the PCP concerning both the disease severity and the disease evolution. The Protectin D1 SPM was protective when looking at the disease severity with a possible implication in the PMN lung infiltration. However, SPMs and more particularly RVD4 high concentration were paradoxically detrimental for the disease evolution, in association with a higher concentration of plasma PGE2. These LMs increased plasma levels were associated with a prejudicial higher Th2 CD4 response and low Th1/Th2 response, possibly limiting the fungus clearance, as previously described. The high concentration of PGE2 and SPM concentrations were correlated with higher level of oleic acid concentration that is obtained in large quantities in the Mediterranean diet. PGE2 seems to have an important role in PCP, considering its direct effect on the adaptative immunity, in addition to its trigger of LM class-switch. Moreover, PGE2 concentration can be modulated by COX-2 targeting anti-inflammatory treatment or by the FA dietary intake. If these results are confirmed on a larger cohort of patients, this would open up new possibilities of therapeutic targets, as well as development of severity and prognosis markers different from the classically studied lymphocyte populations.

Aknowledgement: The authors gratefully acknowledge the cytometry technical platform of the Center for Pathophysiology Toulouse Purpan and especially Fatima L'Faqihi-Olive and Anne-Laure Iscache for their advice and technical support in lymphocyte phenotyping and cytokines measurement experiments.

1. Wickramasekaran RN, Jewell MP, Sorvillo F, Kuo T. The changing trends and profile of pneumocystosis mortality in the United States, 1999-2014. *Mycoses*. 2017;60(9):607-15.
2. Roux A, Canet E, Valade S, Gangneux-Robert F, Hamane S, Lafabrie A, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with or without AIDS, France. *Emerging Infect Dis*. sept 2014;20(9):1490-7.
3. Enomoto T, Azuma A, Kohno A, Kaneko K, Saito H, Kametaka M, et al. Differences in the clinical characteristics of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromized patients with and without HIV infection. *Respirology*. janv 2010;15(1):126-31.
4. Centre de national de référence Mycoses Invasives et Antifongiques. Rapport annuel d'activité 2019 - Année d'exercice 2018 [Internet]. 2019 avr [cité 7 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/file/31034/download>
5. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev*. avr 2012;25(2):297-317.
6. Wright TW, Gigliotti F, Finkelstein JN, McBride JT, An CL, Harmsen AG. Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Invest*. nov 1999;104(9):1307-17.
7. Otieno-Odhiambo P, Wasserman S, Hoving JC. The Contribution of Host Cells to *Pneumocystis* Immunity: An Update. *Pathogens*. 19 avr 2019;8(2).
8. Libby P. Inflammatory mechanisms: the molecular basis of inflammation and disease. *Nutr Rev*. déc 2007;65(12 Pt 2):S140-146.
9. Feehan KT, Gilroy DW. Is Resolution the End of Inflammation? *Trends Mol Med*. 2019;25(3):198-214.
10. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature*. 5 juin 2014;510(7503):92-101.
11. Serhan CN, Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N. Novel Anti-Inflammatory -- Pro-Resolving Mediators and Their Receptors. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(6):629-47.
12. Russell CD, Schwarze J. The role of pro-resolution lipid mediators in infectious disease. *Immunology*. févr 2014;141(2):166-73.
13. Cilloniz C, Pantin-Jackwood MJ, Ni C, Goodman AG, Peng X, Proll SC, et al. Lethal dissemination of H5N1 influenza virus is associated with dysregulation of inflammation and lipoxin signaling in a mouse model of infection. *J Virol*. août 2010;84(15):7613-24.
14. Chiang N, Fredman G, Bäckhed F, Oh SF, Vickery T, Schmidt BA, et al. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature*. 25 avr 2012;484(7395):524-8.
15. Serhan CN, Brain SD, Buckley CD, Gilroy DW, Haslett C, O'Neill LAJ, et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. *FASEB J*. févr 2007;21(2):325-32.
16. Fillaux J, Malvy S, Alvarez M, Fabre R, Cassaing S, Marchou B, et al. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Microbiol Methods*. oct 2008;75(2):258-61.

17. Dubouil B, Le Bouar M, Menard S, Fillaux J, Valentin A, Chauvin P, et al. Recherche de seuils d'interprétation de la PCR *Pneumocystis* sur LBA chez les patients VIH(-), basée sur la mise en évidence de facteurs de risque discriminant la pneumocystose classique des formes pauci ou asymptomatiques. *Journal de Mycologie Médicale*. 1 juin 2016;26(2):e25-6.
18. Damiani C, Le Gal S, Da Costa C, Virmaux M, Nevez G, Totet A. Combined quantification of pulmonary *Pneumocystis jirovecii* DNA and serum (1->3)- β -D-glucan for differential diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia and *Pneumocystis* colonization. *J Clin Microbiol*. oct 2013;51(10):3380-8.
19. Bilan N, Dastranji A, Ghalehgholab Behbahani A. Comparison of the Spo2/Fio2 Ratio and the Pao2/Fio2 Ratio in Patients With Acute Lung Injury or Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Cardiovasc Thorac Res*. 2015;7(1):28-31.
20. Festic E, Bansal V, Kor DJ, Gajic O, US Critical Illness and Injury Trials Group: Lung Injury Prevention Study Investigators (USCIITG-LIPS). SpO2/FiO2 ratio on hospital admission is an indicator of early acute respiratory distress syndrome development among patients at risk. *J Intensive Care Med*. mai 2015;30(4):209-16.
21. Santana AR, de Sousa JL, Amorim FF, Menezes BM, Araújo FVB, Soares FB, et al. SaO2/FiO2 ratio as risk stratification for patients with sepsis. *Crit Care*. 2013;17(Suppl 4):P51.
22. Le Faouder P, Baillif V, Spreadbury I, Motta J-P, Rousset P, Chêne G, et al. LC-MS/MS method for rapid and concomitant quantification of pro-inflammatory and pro-resolving polyunsaturated fatty acid metabolites. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 1 août 2013;932:123-33.
23. Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem*. mai 1957;226(1):497-509.
24. Caspar-Bauguil S, Montastier E, Galinon F, Frisch-Benarous D, Salvayre R, Ritz P. Anorexia nervosa patients display a deficit in membrane long chain poly-unsaturated fatty acids. *Clin Nutr*. juin 2012;31(3):386-90.
25. Hodson L, Skeaff CM, Fielding BA. Fatty acid composition of adipose tissue and blood in humans and its use as a biomarker of dietary intake. *Prog Lipid Res*. sept 2008;47(5):348-80.
26. Li H, Edin ML, Gruzdev A, Cheng J, Bradbury JA, Graves JP, et al. Regulation of T helper cell subsets by cyclooxygenases and their metabolites. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. août 2013;104-105:74-83.
27. Liao Z, Dong J, Wu W, Yang T, Wang T, Guo L, et al. Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPAR γ /NF- κ B pathway. *Respir Res*. 2 déc 2012;13:110.
28. Chiurchiù V, Leuti A, Dalli J, Jacobsson A, Battistini L, Maccarrone M, et al. Pro-resolving lipid mediators Resolvin D1, Resolvin D2 and Maresin 1 are critical in modulating T cell responses. *Sci Transl Med*. 24 août 2016;8(353):353ra111.
29. Beck JM, Liggitt HD, Brunette EN, Fuchs HJ, Shellito JE, Debs RJ. Reduction in intensity of *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice by aerosol administration of gamma interferon. *Infect Immun*. nov 1991;59(11):3859-62.

30. Stansell JD, Osmond DH, Charlebois E, LaVange L, Wallace JM, Alexander BV, et al. Predictors of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected persons. Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group. *Am J Respir Crit Care Med.* janv 1997;155(1):60-6.
31. Beck JM, Newbury RL, Palmer BE, Warnock ML, Byrd PK, Kaltreider HB. Role of CD8+ lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii* in mice. *J Lab Clin Med.* nov 1996;128(5):477-87.
32. Castro M, Morgenthaler TI, Hoffman OA, Standing JE, Rohrbach MS, Limper AH. *Pneumocystis carinii* induces the release of arachidonic acid and its metabolites from alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol.* juill 1993;9(1):73-81.
33. Kernbaum S, Masliah J, Alcindor LG, Bouton C, Christol D. Phospholipase activities of bronchoalveolar lavage fluid in rat *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Br J Exp Pathol.* févr 1983;64(1):75-80.
34. Miyata J, Fukunaga K, Iwamoto R, Isobe Y, Niimi K, Takamiya R, et al. Dysregulated synthesis of protectin D1 in eosinophils from patients with severe asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 1 févr 2013;131(2):353-360.e2.
35. Serhan CN, Gotlinger K, Hong S, Lu Y, Siegelman J, Baer T, et al. Anti-Inflammatory Actions of Neuroprotectin D1/Protectin D1 and Its Natural Stereoisomers: Assignments of Dihydroxy-Containing Docosatrienes. *The Journal of Immunology.* 1 févr 2006;176(3):1848-59.
36. Benfield TL, van Steenwijk R, Nielsen TL, Dichter JR, Lipschik GY, Jensen BN, et al. Interleukin-8 and eicosanoid production in the lung during moderate to severe *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS: a role of interleukin-8 in the pathogenesis of *P. carinii* pneumonia. *Respir Med.* avr 1995;89(4):285-90.
37. Lee JY, Park HJ, Kim YK, Yu S, Chong YP, Kim S-H, et al. Cellular profiles of bronchoalveolar lavage fluid and their prognostic significance for non-HIV-infected patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Clin Microbiol.* avr 2015;53(4):1310-6.
38. Mason GR, Hashimoto CH, Dickman PS, Foutty LF, Cobb CJ. Prognostic implications of bronchoalveolar lavage neutrophilia in patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia and AIDS. *Am Rev Respir Dis.* juin 1989;139(6):1336-42.
39. Molina-Berríos A, Campos-Estrada C, Henriquez N, Faúndez M, Torres G, Castillo C, et al. Protective role of acetylsalicylic acid in experimental *Trypanosoma cruzi* infection: evidence of a 15-epi-lipoxin A₄-mediated effect. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4):e2173.
40. Bafica A, Scanga CA, Serhan C, Machado F, White S, Sher A, et al. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J Clin Invest.* juin 2005;115(6):1601-6.
41. Aliberti J, Serhan C, Sher A. Parasite-induced lipoxin A₄ is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J Exp Med.* 4 nov 2002;196(9):1253-62.
42. Ruan S, McKinley L, Zheng M, Rudner X, D'Souza A, Kolls JK, et al. Interleukin-12 and host defense against murine *Pneumocystis* pneumonia. *Infect Immun.* mai 2008;76(5):2130-7.

43. Kolls JK, Habetz S, Shean MK, Vazquez C, Brown JA, Lei D, et al. IFN- γ and CD8+ T Cells Restore Host Defenses Against *Pneumocystis carinii* in Mice Depleted of CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology*. 1 mars 1999;162(5):2890-4.
44. Zheng Z, Li Y, Jin G, Huang T, Zou M, Duan S. The biological role of arachidonic acid 12-lipoxygenase (ALOX12) in various human diseases. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 1 sept 2020;129:110354.
45. Conrad DJ, Lu M. Regulation of human 12/15-lipoxygenase by Stat6-dependent transcription. *Am J Respir Cell Mol Biol*. févr 2000;22(2):226-34.
46. Heydeck D, Thomas L, Schnurr K, Trebus F, Thierfelder WE, Ihle JN, et al. Interleukin-4 and -13 induce upregulation of the murine macrophage 12/15-lipoxygenase activity: evidence for the involvement of transcription factor STAT6. *Blood*. 1 oct 1998;92(7):2503-10.
47. Witola WH, Liu SR, Montpetit A, Welti R, Hypolite M, Roth M, et al. ALOX12 in Human Toxoplasmosis. *Infect Immun*. juill 2014;82(7):2670-9.
48. Tan W, Wu J, Zhang X, Guo Y, Liu J, Sun T, et al. Associations of functional polymorphisms in cyclooxygenase-2 and platelet 12-lipoxygenase with risk of occurrence and advanced disease status of colorectal cancer. *Carcinogenesis*. 1 juin 2007;28(6):1197-201.
49. Quintana LF, Guzmán B, Collado S, Clària J, Poch E. A coding polymorphism in the 12-lipoxygenase gene is associated to essential hypertension and urinary 12(S)-HETE. *Kidney International*. 1 févr 2006;69(3):526-30.
50. Prockop DJ. Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *Stem Cells*. oct 2013;31(10):2042-6.
51. Tang T, Scambler TE, Smallie T, Cunliffe HE, Ross EA, Rosner DR, et al. Macrophage responses to lipopolysaccharide are modulated by a feedback loop involving prostaglandin E₂, dual specificity phosphatase 1 and tristetraprolin. *Scientific Reports*. 28 juin 2017;7(1):4350.
52. Chan MM-Y, Moore AR. Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E₂-mediated lipoxin A₄ production. *J Immunol*. 1 juin 2010;184(11):6418-26.
53. Loynes CA, Lee JA, Robertson AL, Steel MJ, Ellett F, Feng Y, et al. PGE₂ production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation resolution in vivo. *Sci Adv*. 2018;4(9):eaar8320.
54. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. mai 2008;8(5):349-61.
55. Cheng Z, Abayasekara DRE, Elmes M, Kirkup S, Wathes DC. Effect of oleic acid supplementation on prostaglandin production in maternal endometrial and fetal allantochorion cells isolated from late gestation ewes. *Placenta*. 1 sept 2015;36(9):1011-7.
56. Higa R, White V, Martínez N, Kurtz M, Capobianco E, Jawerbaum A. Safflower and olive oil dietary treatments rescue aberrant embryonic arachidonic acid and nitric oxide metabolism and prevent diabetic embryopathy in rats. *Mol Hum Reprod*. avr 2010;16(4):286-95.

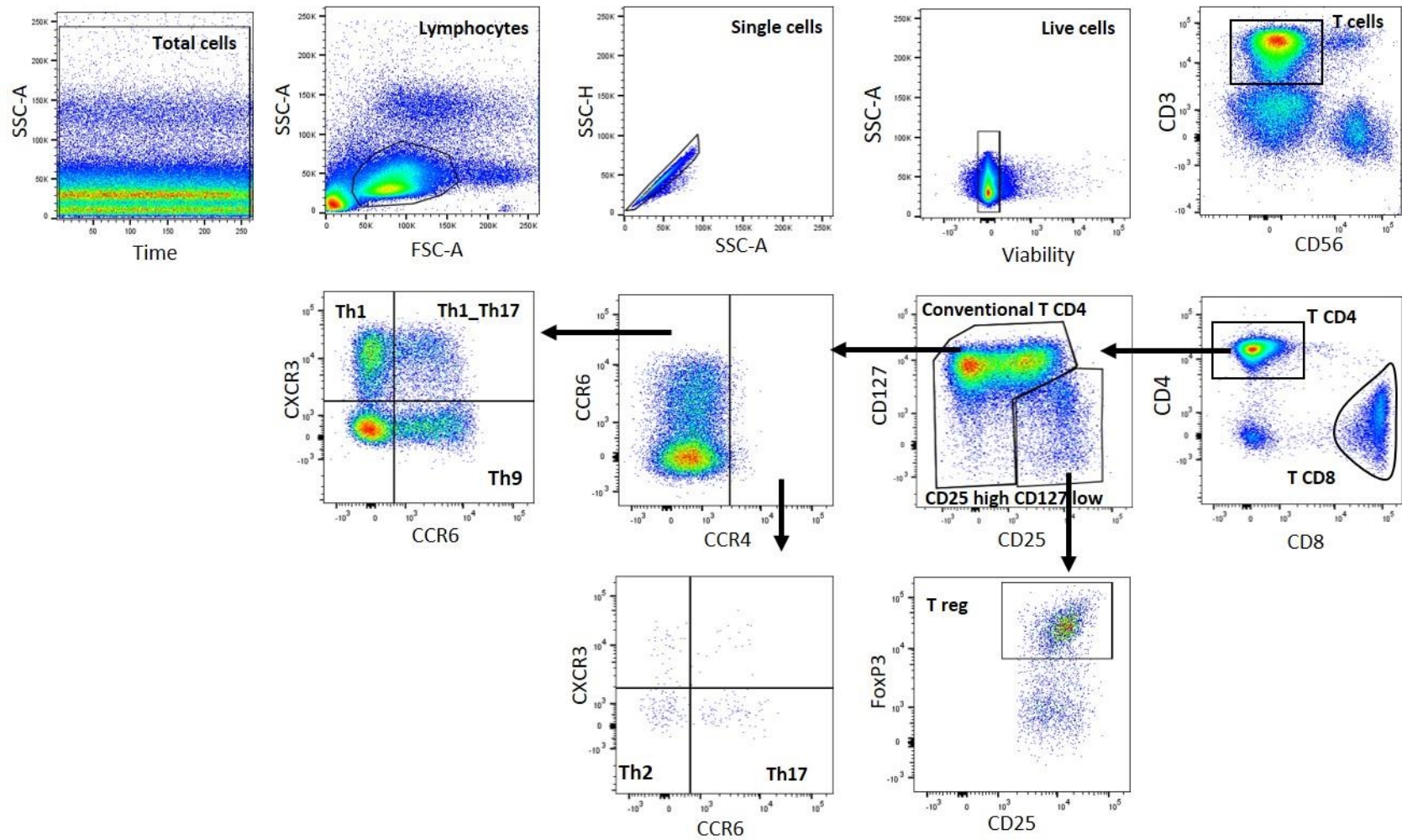
57. Inoue H, Tanabe T, Umesono K. Feedback control of cyclooxygenase-2 expression through PPARgamma. *J Biol Chem.* 8 sept 2000;275(36):28028-32.
58. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, et al. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors α and γ . *PNAS.* 29 avr 1997;94(9):4318-23.
59. Chen C, Shah YM, Morimura K, Krausz KW, Miyazaki M, Richardson TA, et al. Metabolomics Reveals that Hepatic Stearoyl-CoA Desaturase 1 Downregulation Exacerbates Inflammation and Acute Colitis. *Cell Metab.* févr 2008;7(2):135-47.
60. Borniquel S, Jansson EA, Cole MP, Freeman BA, Lundberg JO. Nitrated oleic acid up-regulates PPARgamma and attenuates experimental inflammatory bowel disease. *Free Radic Biol Med.* 15 févr 2010;48(4):499-505.
61. Maschmeyer G, Helweg-Larsen J, Pagano L, Robin C, Cordonnier C, Schellongowski P, et al. ECIL guidelines for treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected haematology patients. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(9):2405-13.

SUPPLEMENTARY DATA :

N°	Age	Sex	Evolution	PCP Severity	IS condition	qPCR Cq	BDG (pg/mL)	SpO2/FiO2 at D0	SpO2/FiO2 at D7	Prophylaxy Anti Pj treatment	CMV PCR	Pulmonary co-infection	Non pulmonary co-infection	ICU admission	High O2 therapy	CTC	Aspirin
1	67,45	M	favorable	severe	SOT	25,66 (BAL)	71	253	306	No	-	b	v	No	No	Yes	Yes
2	62,78	F	favorable	moderate	SOT	27,6 (BAL)	89	332	375	No	-	b	b	No	No	Yes	No
3	34,55	M	favorable	moderate	HIV	27,22 (BAL)	204	346	467	No	+	v	v	Yes	No	No	No
4	71,08	M	favorable	moderate	BC	22,77 (spt)	352	332	383	No	NK	No	No	No	No	Yes	No
5	71,22	M	favorable	severe	SC	21,44 (spt)	207	230	258	No	NK	No	No	No	Yes	Yes	No
6	64,62	M	favorable	moderate	SOT	20,52 (BAL)	1077	404	448	No	NK	b	No	Yes	No	Yes	No
7	75,77	F	favorable	severe	BC	29,78 (Spt)	409	188	297	No	+	No	v	Yes	No	Yes	No
8	81,35	M	favorable	moderate	BC	32,43 (Spt)	125	325	455	No	-	b	No	No	No	Yes	Yes
9	57,57	M	favorable	moderate	HIV	16,03 (Spt)	3811	339	457	No	-	b	v	No	No	No	No
10	53,05	M	favorable	severe	SOT	22,9 (BAL)	3018	294	339	No	NK	b	No	No	No	Yes	Yes
11	47,91	F	favorable	moderate	HIV	23,22 (Spt)	401	408	462	No	NK	b	No	No	No	Yes	No
12	61,31	M	favorable	severe	HIV	23,68 (Spt)	2342	284	448	Yes	+	b	No	No	No	No	No
13	69,18	F	favorable	severe	BC	29,03 (BAL)	229	143	404	Yes	-	No	b	Yes	Yes	No	No
14	54,99	F	favorable	severe	ID	28,2 (Spt)	260	258	433	No	+	No	No	No	No	Yes	No
15	61,16	F	favorable	moderate	ID	25,87 (Spt)	1854	300	438	No	NK	No	No	No	No	Yes	No
16	65,32	M	favorable	moderate	Other	22,2 (Spt)	1217	404	462	No	NK	No	No	No	No	Yes	No
17	58,79	M	favorable	moderate	SOT	20,89 (BAL)	3749	329	452	No	-	b	No	No	No	No	No
18	75,76	F	favorable	severe	ID	18,8 (BAL)	>5000	209	457	No	NK	b	No	No	No	Yes	No
19	58,08	F	unfavorable	moderate	SC	27,98 (Spt)	271	343	261	No	NK	No	No	No	No	Yes	No
20	75,23	M	unfavorable	moderate	SOT	31,82 (BAL)	125	467	332	No	-	b	v	No	No	Yes	Yes
21	86,27	M	unfavorable	moderate	BC	22,13 (Spt)	864	462	329	No	NK	b	No	No	No	Yes	No
22	70,1	M	unfavorable	moderate	BC	19,81 (BAL)	2213	310	193	Yes	-	f,b	b	Yes	Yes	Yes	Yes
23	72,46	F	unfavorable	moderate	BC	23,03 (Spt)	18	471	240	No	-	b	v	Yes	Yes	Yes	No
24	65,95	M	unfavorable	severe	ID	23,36 (Spt)	229	100	100	No	+	f	v	Yes	Yes	No	Yes
25	57,24	F	unfavorable	severe	SC	22,97 (BAL)	874	216	218	No	-	No	No	Yes	Yes	Yes	No
26	68,88	M	NK	moderate	BC	23,23 (Spt)	453	332	NA	No	NK	No	No	No	No	No	No
27	39,17	F	NK	moderate	BC	32,14 (BAL)	168	346	NA	No	NK	No	No	Yes	No	No	No
28	67,72	M	NK	moderate	SOT	30,56 (Spt)	452	376	NA	No	NK	b	No	No	No	Yes	Yes
29	68,30	M	NK	moderate	ID	25,92 (BAL)	125	392	NA	No	NK	v	No	No	No	Yes	Yes
30	64,51	F	NK	moderate	SOT	24,2 (Spt)	3920	467	NA	No	+	No	No	No	No	Yes	No
31	46,64	F	NK	moderate	SOT	25,15 (BAL)	>5000	462	NA	No	-	v	b	No	No	Yes	No
32	22,14	M	NK	moderate	SC	29,91 (BAL)	202	462	NA	No	NK	No	No	No	No	Yes	No
33	75,62	M	NK	moderate	SC	20,98 (Spt)	54	336	NA	No	NK	b	No	No	No	No	No
34	79,26	M	NK	severe	ID	24,27 (BAL)	497	204	NA	No	NK	b	No	No	No	Yes	Yes

Supplementary Table I: Detailed clinical, biological and care characteristics of the patients included for the comparison of PCP severity and PCP evolution

PCP: *Pneumocystis pneumonia*, IS: immunosuppression, Cq: quantification cycle threshold, D0: Day 0 of the diagnosis; D7: Day 7 post diagnosis; CMV: Cytomegalovirus; Pj: *Pneumocystis jirovecii*; ICU: Intensive care unit; High O2 therapy: High-flow oxygen therapy; CTC: corticosteroids, NK: not known; SOT: Solid Organ Transplant; BC: blood cancer; ID: inflammatory diseases; SC: solid cancer; BAL: broncho-alveolar lavages, Spt: sputum or tracheal aspiration; b: bacteria, v: virus, f: fungus.



Supplementary Figure 1: Gating strategy for lymphocyte immunophenotyping

Conclusion de l'article 3

Les SPM ont été dosés pour la première fois chez des patients atteints de PCP et leurs concentrations ont été comparées en fonction de la sévérité et de l'évolution de la maladie.

De façon intéressante, cette étude a confirmé les résultats du travail effectué sur le modèle murin. De fortes concentrations en PGE2 et en SPM (en particulier issus du métabolisme de la 12-LOX) ont été retrouvées chez les patients présentant une évolution défavorable. Ces patients présentaient également une réponse CD4 Th2 plus forte et un ratio Th1/Th2 abaissé. L'importante réponse des CD8 Tc1 n'étaient pas associée à l'évolution de la maladie, mais plutôt à une meilleure clairance du champignon. La PGE2 était corrélée négativement avec l'évolution de la maladie. De fortes concentrations en PGE2 étaient associées à de plus faible concentration d'IFN γ et à de plus forte production de certains SPM, comme la résolvine D1 qui semble inhiber la réponse Th1.

Par ailleurs, l'évaluation des concentrations sanguines des médiateurs lipidiques en fonction de la sévérité de la maladie a montré des résultats différents et indépendants de ceux observés en étudiant l'évolution de la maladie. En effet, la sévérité de la maladie était associée avec une diminution d'un SPM, la protectine D1. Compte tenu de la capacité de la protectine D1 à inhiber le chimiotactisme des PNN (284), sa diminution chez les patients sévères pourrait être liée à la plus forte concentration en IL-8 observée chez ces mêmes patients graves, et probablement à une plus forte infiltration pulmonaire en PNN (déjà associée chez l'Homme avec une sévérité de la PCP) (277,278).

Ces différences d'effet des SPM en fonction de la sévérité à J0 ou de l'évolution de la maladie étaient cependant concordantes avec l'absence d'association observée dans cette étude entre la sévérité des patients à J0 et leur évolution sept jours plus tard.

Ainsi, les SPM, en particulier la protectine D1, pourraient avoir un effet favorable sur la sévérité de la PCP en diminuant l'infiltration pulmonaire des PNN. A l'inverse, les SPMs, dont les résolvines, pourraient être défavorables pour l'évolution de la maladie en favorisant une réponse Th2 et en diminuant le ratio Th1/Th2 qui est alors associée avec une mauvaise évolution de la maladie.

Conclusion générale

A l'issu des travaux menés au cours de cette thèse, il apparait qu'une infection à *Pneumocystis* induit une réponse immune différente selon le statut immunitaire de l'hôte infecté. Cela avait déjà été évoqué dans des études réalisées sur modèle murin, avec l'observation d'une polarisation macrophagique différente (M2 chez les rats immunocompétents, M1 chez les rats immunodéprimés) (210).

Les résultats obtenus dans les trois articles de ce manuscrit ont été rassemblés et interprétés en association avec les données bibliographiques existantes. Ainsi, un modèle hypothétique de la réponse immune lors d'une d'infection à *Pneumocystis* a été construit pour les hôtes immunocompétents et pour les hôtes immunodéprimés. La figure 29 représente ces deux modèles sous forme schématique.

Réponse immune hypothétique chez les hôtes immunocompétents :

La réponse immune chez l'immunocompétent semble reposer sur la formation de structures iBALT, regroupant une majorité de lymphocytes B accompagnés de lymphocytes T et de macrophages, probablement de polarisation M2.

Pneumocystis sp. présent au niveau alvéolaire, peut entrainer une première réponse *via* les cellules épithéliales et les CPA, dont les cellules dendritiques. Les CPA activeraient alors les T CD4 spécifiques en leur présentant les antigènes du champignon, par l'intermédiaire du CMH II, qui activeraient à leur tour les lymphocytes B. Les T CD4 pourraient alors s'orienter vers une différenciation Tfh, en présence d'IL-6 (mais aussi de TGF β et d'ICOS) et dans des conditions de communication étroite avec les lymphocytes B (via le CD40). Les T CD4 et les LB activeraient les macrophages et les orienteraient vers une polarisation M2, en lien avec la production d'IL-10 par les lymphocytes B, comme cela a été décrit au cours d'une étude chez les souris (239). Les macrophages activés M2 élimineraient ainsi le champignon par phagocytose, avec ou sans opsonisation. La PGE2 augmentée au pic de l'inflammation induirait alors la production des SPM dont les résolvines qui limiterait l'infiltration pulmonaire par les PNN.

Ce modèle hypothétique concorde avec les publications existantes sur les facteurs de risque de PCP associés aux populations lymphocytaires (chez la souris et chez l'Homme). En effet, la réponse immune

est ici basée sur les cellules LB et CD4 qui ont été caractérisées comme cruciales pour contrôler une infection à *Pneumocystis sp.* chez l'Homme comme chez la souris (8,9,226,285). De plus, la communication entre les deux types cellulaires est essentielle pour la formation de la structure iBALT, en cohérence avec le risque de PCP associé à un déficit en CD40 chez l'Homme et chez la souris (226,230). Bien que la formation de l'iBALT soit réduite en l'absence de Th2 ou Th17, ce modèle de réponse immune ne dépend pas directement des réponses Th1, ni des réponses Th2 ou Th17, (286) ce qui concorde avec l'absence de susceptibilité à la PCP des souris déplétées spécifiquement en cytokines IFN γ , IL-4, IL-17 (uniquement un retard de clairance en l'absence d'IL-17) (202,209,222). En revanche, les T CD4 régulateurs pourraient avoir un rôle important dans la différenciation des T CD4 Tfh qui nécessitent un environnement riche en TGF. Ceci est en cohérence avec le risque de PCP associé au déficit héréditaire en Fox P3 et dans certaines expériences chez la souris déplétées en TCD4 régulateurs (203,224). Les T CD8 auraient peu d'impact sur l'infection à *Pneumocystis*, comme cela a été décrit chez les souris immunocompétentes (221). Enfin, ce modèle serait lié à une polarisation M2 des macrophages, comme cela a été observé dans plusieurs études chez les souris immunocompétentes (209,210). En revanche, le rôle des anticorps n'a pas été évalué durant les travaux de cette thèse et les données bibliographiques ne permettent pas de déterminer l'importance de son rôle dans l'élimination de *Pneumocystis*, avec un risque faible de PCP chez les patients atteints de la maladie de Bruton ou du déficit héréditaire en Stat3 (233–236).

Réponse immune hypothétique chez les hôtes immunodéprimés :

Les hôtes immunodéprimés, déplétés en T CD4, en LB ou dans les deux types lymphocytaires, ne pourraient plus induire la formation des structures iBALT qui nécessite la communication de ces deux types cellulaires. Par exemple, une corticothérapie peut entraîner une inhibition multiple des cellules T CD4, des LB et de la production d'IL-6 par les monocytes, les cellules épithéliales et endothéliales. Les T CD4 présents sont alors activés de façon retardée et inefficace puisque toutes les populations de CD4 helper sont augmentées fortement. Il en est de même pour les T CD4 régulateurs. Les T CD4 ne sont alors pas spécifiquement orientés vers un profil Th. A l'inverse, les T CD8 sont, eux, fortement différenciés vers un profil Tc1. Dans ces conditions, une réponse davantage orientée vers les Th1/Tc1 semble améliorer l'évolution de la maladie. Les Th1 pourraient activer les macrophages vers une polarisation M1, qui est capable d'éliminer efficacement le champignon par phagocytose. Par ailleurs, une forte différenciation Tc1 et un nombre important de cellules NK peut également augmenter l'activation de macrophages M1, par la production d'IFN- γ .

Dans ce contexte, d'immunodépression, la PGE2 pourrait avoir un rôle clé au travers de l'inhibition de la réponse Th1 ainsi que par le switch lipidique à l'origine de la production de SPM, qu'elle entraîne. Dans le contexte d'infection à *Pneumocystis*, les SPM et notamment les résolvines, pourraient également inhiber la réponse Th1, renforçant ainsi une réponse Th2. Ainsi une forte concentration de PGE2 pourrait conduire directement et indirectement à la diminution du ratio Th1/Th2 et donc induire une réponse moins favorable pour la maladie. Cependant, comme chez les hôtes immunocompétents, certains SPM, dont la protectine D1, pourrait avoir un rôle favorable en diminuant l'infiltration pulmonaire des PNN qui sont généralement associés à une sévérité de la maladie.

Enfin la concentration de PGE2 et de SPM pourrait être impactée par l'apport alimentaire en acides gras (omega 3, omega 6, omega 9). Un régime enrichi en omega 6 diminue paradoxalement la concentration en PGE2 et est ainsi associé à une meilleure évolution de la PCP. Un régime enrichi en omega 3 est associé à une diminution de la concentration de PGE2 et induit aussi une plus forte concentration en SPM dérivés des omega 3. Cependant, ce régime n'est pas associé à une meilleure évolution de la PCP. Quant au régime en acide oléique (omega 9), bien qu'il ne soit pas directement un AG précurseur de SPM, il pourrait induire une augmentation de la PGE2 en stimulant la voie PPAR γ et la production de COX2.

Ce modèle de réponse immune chez l'hôte immunodéprimé est cohérent avec certaines études chez l'Homme et chez la souris qui retrouvent également une réponse Th1/Tc1 favorable (203,259,287,288). La capacité des macrophages M1 à phagocyter *Pneumocystis* a également été démontrée chez la souris. L'influence des cellules NK a été peu étudiée au cours de la PCP, comme les médiateurs lipidiques de résolution de l'inflammation ou l'influence du régime.

Néanmoins, ce modèle se rapproche d'expériences réalisées sur le modèle murin de la tuberculose, au cours duquel un régime enrichi en AG oméga 6 semble également protecteur, en lien avec une meilleure polarisation M1 des macrophages (289,290). Toujours chez le modèle murin de la tuberculose, l'inhibition du SPM lipoxine A4 a induit une amélioration clinique ainsi qu'une meilleure clairance de la bactérie (175).

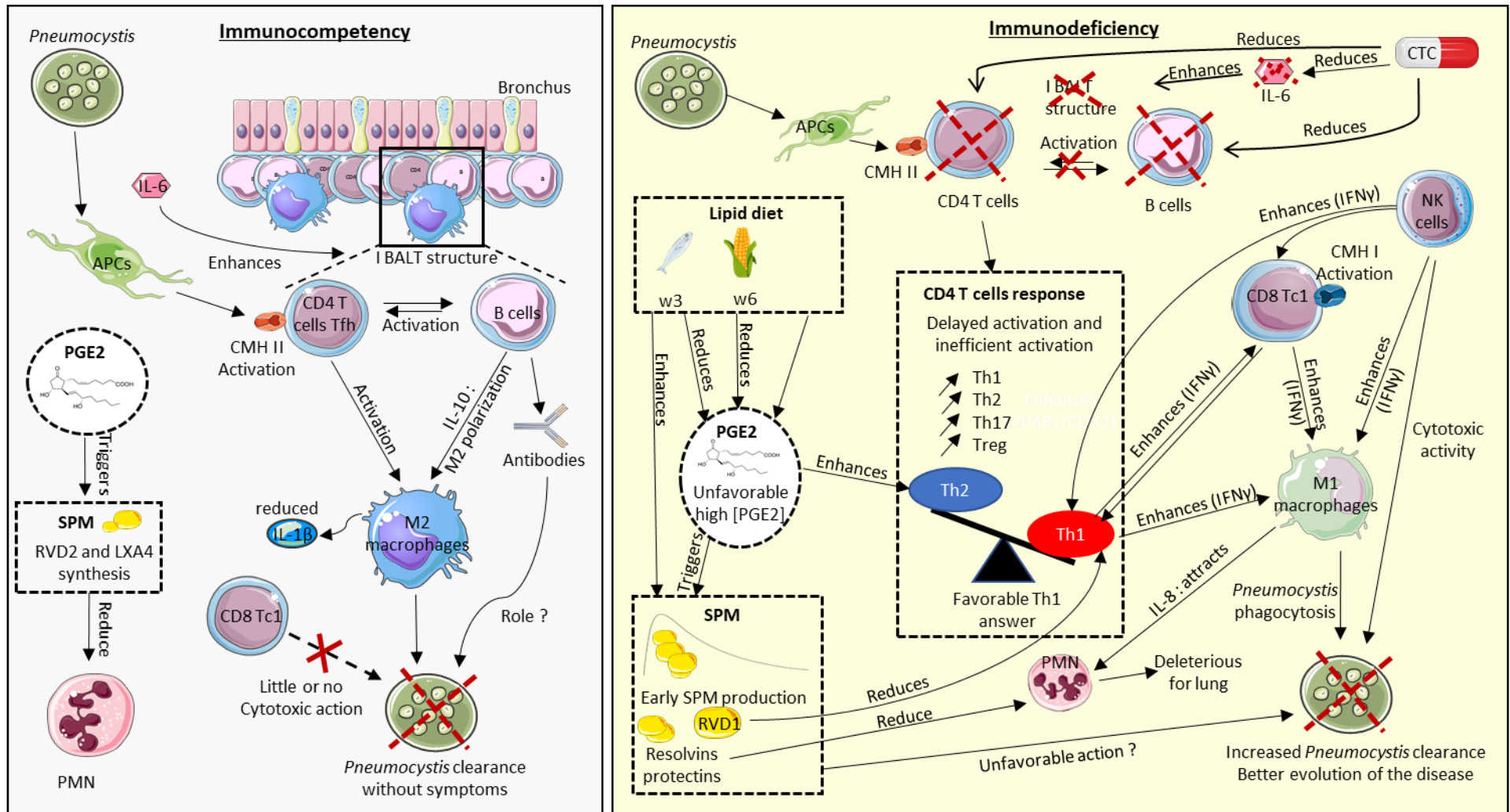


Figure 29 : Modèle hypothétique des réponses immunes au cours de la pneumocystose chez l'hôte immunocompétent et chez l'hôte immunodéprimé

Légende de la figure 29 :

APC: Antigen presenting cells ; CD4 Tfh: CD4 T follicular helper ; PGE2: Prostaglandine E2 ; SPM: Specialized Proresolving lipid Mediators ; RVD2: Resolvin D2 ; LXA4: Lipoxin A4 ; PMN: polymorphonuclear neutrophils ; iBALT: induced bronchus-associated lymphoid tissue ; CTC: corticosteroids

Chez un hôte immunocompétent (à gauche), *Pneumocystis* est détecté par les CPA qui activent la réponse T CD4, activant à leur tour les lymphocytes B. En présence d'IL-6 et à proximité des LB, les T CD4 peuvent se différencier en Tfh. L'action commune des LB et des Tfh activent les macrophages avec une polarisation préférentielle M2, qui produit peu d'IL-1 β pro-inflammatoire. Les macrophages peuvent alors phagocyter *Pneumocystis*, avec ou sans opsonisation. Les T D8 ont peu ou pas d'action dans ce contexte. La PGE2 induit la production de SPM dont la résolvine D2, qui a la capacité de diminuer l'infiltration pulmonaire des PNN délétères pour les poumons. Cette réponse immune permet la clairance du champignon, sans symptômes respiratoires.

Chez un hôte immunodéprimé (à droite), en l'absence de T CD4, de LB ou des deux populations lymphocytaires, la réponse immune n'est pas correctement activée. Par exemple, un traitement par corticostéroïdes a un effet multiple sur les T CD4, les LB et l'IL-6, et empêche ainsi la formation de la structure iBALT observée chez les hôtes infectés immunocompétents. Une réponse Th1 majoritaire est favorable à l'évolution de la PCP, avec une meilleure clairance du champignon par stimulation des macrophages M1. De même, les T CD8 différenciés en Tc1 cytotoxiques et les cellules NK peuvent participer à la stimulation des macrophages vers une polarisation M1, par la sécrétion d'IFN γ . Les macrophages M1 peuvent phagocyter *Pneumocystis*. La PGE2 a un rôle central dans la physiopathologie de la PCP par inhibition de la réponse Th1 et par stimulation des SPM, eux même inhibiteurs de la réponse Th1. Les SPM peuvent aussi participer à la diminution de l'infiltration de PNN, notamment la protectine D1. Un régime enrichi en omega 6 diminue la concentration en PGE2 et est associé à une bonne évolution de la maladie. A l'inverse, l'acide oléique (omega 9) est associé à une plus forte concentration en PGE2, par la voie PPAR γ et COX-2. Un régime enrichi en omega 3 est associé à une plus faible concentration en PGE2 mais à de fortes concentrations en SPM dérivés des omega 3.

Perspectives

Dans un avenir proche, différentes expériences ou analyses sont prévues pour compléter les résultats présentés dans ce manuscrit :

Dans l'étude basée sur le modèle murin (Distinct Inflammatory responses to *Pneumocystis murina* infection according to the host immune status: implication of immune cells, pro-inflammatory and pro-resolving lipid profile) :

- Une analyse quantitative automatisée de l'immuno-histochimie est prévue sur l'ensemble des souris, y compris les souris ayant reçu des régimes, afin de pouvoir comparer l'infiltration quantitativement et qualitativement des PNN, macrophages, lymphocytes T et lymphocytes B.
- Un dosage des acides gras précurseurs sera réalisé chez les souris avec un régime enrichi et sera comparé avec les souris malades sans régime enrichi.
- Une seconde expérience avec des groupes de souris immunodéprimées et infectées et régimes enrichis en oméga 3 ou oméga 6 sera réalisé afin de confirmer les résultats obtenus sur la première expérience. Un groupe avec un régime enrichi en acide oléique pourra être ajouté à la vue des résultats obtenus dans l'étude clinique.

Dans la seconde étude clinique (Impact of pro-inflammatory and pro-resolving lipid mediators on *Pneumocystis pneumonia* severity and evolution in Human) :

- Une mesure de l'expression des différentes enzymes impliquées dans le métabolisme des SPM (dont la PLA2, les COX et les LOX) sera utile afin de pouvoir comprendre les variations de concentration en PGE2 et des SPM observées entre les patients.
- Une analyse statistique globale, sans à priori, sera réalisée afin d'étudier l'ensemble des données obtenues.

Les travaux de cette thèse ont par ailleurs levé de nouvelles interrogations qui nécessitent une confirmation ou un approfondissement, au travers d'études interventionnelles sur le modèle murin :

- Le déficit spécifique en T CD4 folliculaire helper n'a jamais été évalué, à notre connaissance, dans le contexte d'une infection à *Pneumocystis sp*, que ce soit sur le modèle murin ou chez l'Homme. Afin d'affirmer le rôle essentiel des CD4 Tfh, une infection par *P. murina* pourrait

être réalisée chez des souris Bcl6^{-/-} comme cela a déjà été fait dans d'autres modèles (291,292), Bcl6 étant le facteur de transcription principal relié à une différenciation T_H17.

- D'un autre côté, il pourrait être intéressant d'évaluer l'effet de l'administration d'IL-6 sur la formation des iBALT chez des souris immunodéprimées par corticothérapie et infectées par *P. murina*.
- Il serait intéressant d'étudier, par des expériences interventionnelles directes, l'impact de l'eicosanoïde PGE2 et des SPM, notamment les résolvines D1 et D2 et les protectines. Par exemple, il serait possible de compléter les souris malades en PGE2 comme cela a été fait précédemment (293), et d'évaluer si on observe une plus forte concentration de SPM, une diminution du ratio Th1/Th2 et une aggravation de la maladie. Il est également possible de cibler plus précisément des SPMs, comme par exemple la résolvine D2 en utilisant des souris KO en récepteur DRV2 (récepteur de la résolvine D2) (294).
- Chez les souris comme chez l'Homme, la bonne évolution de la maladie était davantage reliée à une réponse inflammatoire associée à une meilleure élimination du champignon *Pneumocystis*. Or, les sujets des deux études cliniques étaient traités par un anti-microbien adapté pour la lutte contre *Pneumocystis*. Ainsi, il pourrait être intéressant d'identifier l'impact isolé d'un enrichissement en Th1, d'un traitement par cotrimoxazole isolé et l'association des deux afin d'évaluer l'effet et l'interaction de ces éléments.
- La quasi-totalité des études menées chez les rongeurs correspondent à des primo-infections. Or, l'Homme s'infecte généralement durant l'enfance et présentent par la suite des réinfections. Une étude des populations lymphocytaires après un premier challenge se rapprocherait davantage des conditions pathologiques chez l'Homme, et permettrait d'étudier l'impact des cellules mémoires, qui étaient associées à une meilleure survie dans la première étude clinique de cette thèse (Blood circulating lymphocyte phenotyping identifies risk factors for severe *Pneumocystis jirovecii* pneumonia)

Par ailleurs, ces travaux ont révélé de potentiels marqueurs biologiques qui nécessitent d'être étudiés sur de plus grandes cohortes afin de confirmer ou d'infirmer leur intérêt clinique. Le nombre de LB pourrait constituer un marqueur de risque de PCP, potentiellement combiné avec le nombre de T CD4. Par ailleurs, le ratio Th1/Th2, la proportion de CD8 Tc1 et de CD8 effecteurs ou CD8 centraux mémoires, le nombre de cellules NK ou encore le nombre total de lymphocytes pourraient avoir un intérêt en tant que marqueurs pronostic de la PCP. De même, de fortes concentrations de PGE2 et de SPMs pourraient être associées à une mauvaise évolution dans la maladie.

Enfin, l'impact défavorable ou protecteur des régimes lipidiques enrichis en oméga 9 ou en oméga 6, respectivement, nécessite d'être contrôlé sur une nouvelle étude clinique.

Références

1. Stringer JR, Beard CB, Miller RF, Wakefield AE. A new name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from humans. *Emerging Infect Dis.* sept 2002;8(9):891-6.
2. Gangneux J-P, Bougnoux M-E, Hennequin C, Godet C, Chandenier J, Denning DW, et al. An estimation of burden of serious fungal infections in France. *J Mycol Med.* déc 2016;26(4):385-90.
3. Centre de national de référence Mycoses Invasives et Antifongiques. Rapport annuel d'activité 2019 - Année d'exercice 2018 [Internet]. 2019 avr [cité 7 juill 2020]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/file/31034/download>
4. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev.* avr 2012;25(2):297-317.
5. Otieno-Odhiambo P, Wasserman S, Hoving JC. The Contribution of Host Cells to *Pneumocystis* Immunity: An Update. *Pathogens.* 19 avr 2019;8(2).
6. Catherinot E, Lanternier F, Bougnoux M-E, Lecuit M, Couderc L-J, Lortholary O. *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Infect Dis Clin North Am.* mars 2010;24(1):107-38.
7. Wieruszewski PM, Barreto JN, Frazee E, Daniels CE, Tosh PK, Dierkhising RA, et al. Early Corticosteroids for *Pneumocystis* Pneumonia in Adults Without HIV Are Not Associated With Better Outcome. *Chest.* 2018;154(3):636-44.
8. Stansell JD, Osmond DH, Charlebois E, LaVange L, Wallace JM, Alexander BV, et al. Predictors of *Pneumocystis carinii* pneumonia in HIV-infected persons. *Pulmonary Complications of HIV Infection Study Group.* *Am J Respir Crit Care Med.* janv 1997;155(1):60-6.
9. Shellito J, Suzara VV, Blumenfeld W, Beck JM, Steger HJ, Ermak TH. A new model of *Pneumocystis carinii* infection in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. *J Clin Invest.* mai 1990;85(5):1686-93.
10. Serhan CN. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. *Nature.* 5 juin 2014;510(7503):92-101.
11. Calderón-Sandubete EJ, Varela-Aguilar JM, Medrano-Ortega FJ, Nieto-Guerrer V, Respaldiza-Salas N, de la Horra-Padilla C, et al. Historical perspective on *Pneumocystis carinii* infection. *Protist.* sept 2002;153(3):303-10.
12. Edman JC, Kovacs JA, Masur H, Santi DV, Elwood HJ, Sogin ML. Ribosomal RNA sequence shows *Pneumocystis carinii* to be a member of the fungi. *Nature.* 11 août 1988;334(6182):519-22.
13. Stringer SL, Stringer JR, Blase MA, Walzer PD, Cushion MT. *Pneumocystis carinii*: sequence from ribosomal RNA implies a close relationship with fungi. *Exp Parasitol.* mai 1989;68(4):450-61.
14. Cushion MT, Walzer PD, Smulian AG, Linke MJ, Ruffolo JJ, Kaneshiro ES, et al. Terminology for the life cycle of *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun.* oct 1997;65(10):4365; author reply 4366.

15. Durand-Joly I, Aliouat EM, Recourt C, Guyot K, François N, Wauquier M, et al. *Pneumocystis carinii* f. sp. hominis is not infectious for SCID mice. *J Clin Microbiol.* mai 2002;40(5):1862-5.
16. Gigliotti F, Harmsen AG, Haidaris CG, Haidaris PJ. *Pneumocystis carinii* is not universally transmissible between mammalian species. *Infect Immun.* juill 1993;61(7):2886-90.
17. Stringer JR, Cushion MT, Wakefield AE. New nomenclature for the genus *Pneumocystis*. *J Eukaryot Microbiol.* 2001;Suppl:184S-189S.
18. Gigliotti F, Limper AH, Wright T. *Pneumocystis*. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 12 janv 2014;4(12):a019828.
19. Limper AH, Standing JE, Hoffman OA, Castro M, Neese LW. Vitronectin binds to *Pneumocystis carinii* and mediates organism attachment to cultured lung epithelial cells. *Infect Immun.* oct 1993;61(10):4302-9.
20. Yoneda K, Walzer PD. Attachment of *Pneumocystis carinii* to Type I Alveolar Cells Studied by Freeze-Fracture Electron Microscopy. *Infect Immun.* mai 1983;40(2):812-5.
21. Yu ML, Limper AH. *Pneumocystis carinii* induces ICAM-1 expression in lung epithelial cells through a TNF-alpha-mediated mechanism. *Am J Physiol.* 1997;273(6):L1103-1111.
22. Hauser PM, Burdet FX, Cissé OH, Keller L, Taffé P, Sanglard D, et al. Comparative genomics suggests that the fungal pathogen *Pneumocystis* is an obligate parasite scavenging amino acids from its host's lungs. *PLoS ONE.* 20 déc 2010;5(12):e15152.
23. Cissé OH, Pagni M, Hauser PM. Comparative Genomics Suggests That the Human Pathogenic Fungus *Pneumocystis jirovecii* Acquired Obligate Biotrophy through Gene Loss. *Genome Biol Evol.* 24 juill 2014;6(8):1938-48.
24. Ma L, Chen Z, Huang DW, Kutty G, Ishihara M, Wang H, et al. Genome analysis of three *Pneumocystis* species reveals adaptation mechanisms to life exclusively in mammalian hosts. *Nat Commun.* 22 févr 2016;7:10740.
25. Wakefield AE. DNA sequences identical to *Pneumocystis carinii* f. sp. *carinii* and *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* in samples of air spora. *J Clin Microbiol.* juill 1996;34(7):1754-9.
26. Casanova-Cardiel L, Leibowitz MJ. Presence of *Pneumocystis carinii* DNA in pond water. *J Eukaryot Microbiol.* déc 1997;44(6):28S.
27. Dei Cas E, Soulez B, Palluault F, Charet P, Camus D. *Pneumocystis carinii*, un défi pour le biologiste. *Revue médecine / sciences.* 1990;6(6):p.517-525.
28. Martinez A, Halliez MCM, Aliouat EM, Chabé M, Standaert-Vitse A, Fréalle E, et al. Growth and airborne transmission of cell-sorted life cycle stages of *Pneumocystis carinii*. *PLoS ONE.* 2013;8(11):e79958.
29. Cushion MT, Linke MJ, Ashbaugh A, Sesterhenn T, Collins MS, Lynch K, et al. Echinocandin treatment of *Pneumocystis* pneumonia in rodent models depletes cysts leaving trophic burdens that cannot transmit the infection. *PLoS ONE.* 29 janv 2010;5(1):e8524.
30. Yoshida Y. Ultrastructural studies of *Pneumocystis carinii*. *J Protozool.* févr 1989;36(1):53-60.

31. Beck JM, Cushion MT. *Pneumocystis* workshop: 10th anniversary summary. *Eukaryotic Cell*. avr 2009;8(4):446-60.
32. Almeida JMGCF, Cissé OH, Fonseca Á, Pagni M, Hauser PM. Comparative genomics suggests primary homothallism of *Pneumocystis* species. *mBio*. 13 janv 2015;6(1).
33. Richard S, Almeida JMGCF, Cissé OH, Luraschi A, Nielsen O, Pagni M, et al. Functional and Expression Analyses of the *Pneumocystis* MAT Genes Suggest Obligate Sexuality through Primary Homothallism within Host Lungs. *mBio*. 20 2018;9(1).
34. Aliouat el-M null, Dujardin L, Martinez A, Duriez T, Ricard I, Dei-Cas E. *Pneumocystis carinii* growth kinetics in culture systems and in hosts: involvement of each life cycle parasite stage. *J Eukaryot Microbiol*. oct 1999;46(5):116S-117S.
35. Hauser PM, Cushion MT. Is sex necessary for the proliferation and transmission of *Pneumocystis*? *PLoS Pathog*. 2018;14(12):e1007409.
36. Menotti J, Emmanuel A, Bouchekouk C, Chabe M, Choukri F, Pottier M, et al. Evidence of airborne excretion of *Pneumocystis carinii* during infection in immunocompetent rats. Lung involvement and antibody response. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e62155.
37. Fréalle E, Valade S, Guigue N, Hamane S, Chabé M, Le Gal S, et al. Diffusion of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* colonization: frequency and putative risk factors. *Med Mycol*. 1 juill 2017;55(5):568-72.
38. Choukri F, Menotti J, Sarfati C, Lucet J-C, Nevez G, Garin YJF, et al. Quantification and spread of *Pneumocystis jirovecii* in the surrounding air of patients with *Pneumocystis* pneumonia. *Clin Infect Dis*. 1 août 2010;51(3):259-65.
39. Chabé M, Dei-Cas E, Creusy C, Fleurisse L, Respaldiza N, Camus D, et al. Immunocompetent hosts as a reservoir of *Pneumocystis* organisms: histological and rt-PCR data demonstrate active replication. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. févr 2004;23(2):89-97.
40. Gigliotti F, Wright TW. *Pneumocystis*: where does it live? *PLoS Pathog*. 2012;8(11):e1003025.
41. Cere N, Drouet-Viard F, Dei-Cas E, Chanteloup N, Coudert P. In utero transmission of *Pneumocystis carinii* sp. f. *oryctolagi*. *Parasite*. déc 1997;4(4):325-30.
42. Sanchez CA, Chabé M, Aliouat EM, Durand-Joly I, Gantois N, Conseil V, et al. Exploring transplacental transmission of *Pneumocystis oryctolagi* in first-time pregnant and multiparous rabbit does. *Med Mycol*. déc 2007;45(8):701-7.
43. Montes-Cano MA, Chabe M, Fontillon-Alberdi M, de-Lahorra C, Respaldiza N, Medrano FJ, et al. Vertical transmission of *Pneumocystis jirovecii* in humans. *Emerging Infect Dis*. janv 2009;15(1):125-7.
44. Thomas CF, Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia. *N Engl J Med*. 10 juin 2004;350(24):2487-98.
45. Alexandre K, Ingen-Housz-Oro S, Versini M, Sailler L, Benhamou Y. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients treated with rituximab for systemic diseases: Report of 11 cases and review of the literature. *Eur J Intern Med*. 2018;50:e23-4.

46. Roux A, Canet E, Valade S, Gangneux-Robert F, Hamane S, Lafabrie A, et al. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with or without AIDS, France. *Emerging Infect Dis.* sept 2014;20(9):1490-7.
47. Tasaka S, Tokuda H. *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected patients in the era of novel immunosuppressive therapies. *J Infect Chemother.* déc 2012;18(6):793-806.
48. Peglow SL, Smulian AG, Linke MJ, Pogue CL, Nurre S, Crisler J, et al. Serologic responses to *Pneumocystis carinii* antigens in health and disease. *J Infect Dis.* févr 1990;161(2):296-306.
49. Pifer LL, Hughes WT, Stagno S, Woods D. *Pneumocystis carinii* infection: evidence for high prevalence in normal and immunosuppressed children. *Pediatrics.* janv 1978;61(1):35-41.
50. Respaldiza N, Medrano FJ, Medrano AC, Varela JM, de la Horra C, Montes-Cano M, et al. High seroprevalence of *Pneumocystis* infection in Spanish children. *Clin Microbiol Infect.* nov 2004;10(11):1029-31.
51. Vargas SL, Hughes WT, Santolaya ME, Ulloa AV, Ponce CA, Cabrera CE, et al. Search for primary infection by *Pneumocystis carinii* in a cohort of normal, healthy infants. *Clin Infect Dis.* 15 mars 2001;32(6):855-61.
52. Wakefield AE, Stewart TJ, Moxon ER, Marsh K, Hopkin JM. Infection with *Pneumocystis carinii* is prevalent in healthy Gambian children. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* déc 1990;84(6):800-2.
53. Sing A, Roggenkamp A, Autenrieth IB, Heesemann J. *Pneumocystis carinii* carriage in immunocompetent patients with primary pulmonary disorders as detected by single or nested PCR. *J Clin Microbiol.* oct 1999;37(10):3409-10.
54. Calderón EJ, Regordan C, Medrano FJ, Ollero M, Varela JM. *Pneumocystis carinii* infection in patients with chronic bronchial disease. *Lancet.* 6 avr 1996;347(9006):977.
55. Medrano FJ, Montes-Cano M, Conde M, de la Horra C, Respaldiza N, Gasch A, et al. *Pneumocystis jirovecii* in General Population. *Emerg Infect Dis.* févr 2005;11(2):245-50.
56. Larsen HH, von Linstow M-L, Lundgren B, Høgh B, Westh H, Lundgren JD. Primary *Pneumocystis* infection in infants hospitalized with acute respiratory tract infection. *Emerging Infect Dis.* janv 2007;13(1):66-72.
57. Özkoç S, Köker M, Önder M, Delibaş SB. Prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in autopsy cases in Turkey. *J Med Microbiol.* oct 2016;65(10):1152-7.
58. Ponce CA, Gallo M, Bustamante R, Vargas SL. *Pneumocystis* Colonization Is Highly Prevalent in the Autopsied Lungs of the General Population. *Clin Infect Dis.* 1 févr 2010;50(3):347-53.
59. Chen W, Gigliotti F, Harmsen AG. Latency is not an inevitable outcome of infection with *Pneumocystis carinii*. *Infect Immun.* déc 1993;61(12):5406-9.
60. Chabé M, Durand-Joly I, Dei-Cas E. [Transmission of *Pneumocystis* infection in humans]. *Med Sci (Paris).* juill 2012;28(6-7):599-604.
61. Montes-Cano MA, de la Horra C, Dapena FJ, Mateos I, Friaiza V, Respaldiza N, et al. Dynamic colonisation by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect.* oct 2007;13(10):1008-11.

62. Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases-Estimate Precision. *J Fungi (Basel)*. 18 oct 2017;3(4).
63. Morris A, Lundgren JD, Masur H, Walzer PD, Hanson DL, Frederick T, et al. Current Epidemiology of *Pneumocystis* Pneumonia. *Emerg Infect Dis*. oct 2004;10(10):1713-20.
64. Kaplan JE, Hanson D, Dworkin MS, Frederick T, Bertolli J, Lindegren ML, et al. Epidemiology of human immunodeficiency virus-associated opportunistic infections in the United States in the era of highly active antiretroviral therapy. *Clin Infect Dis*. avr 2000;30 Suppl 1:S5-14.
65. Tieu J, Smith R, Basu N, Brogan P, D'Cruz D, Dhaun N, et al. Rituximab for maintenance of remission in ANCA-associated vasculitis: expert consensus guidelines-Executive summary. *Rheumatology (Oxford)*. 01 2020;59(4):727-31.
66. Zalmanovich A, Ben-Ami R, Rahav G, Alon D, Moses A, Olshtain-Pops K, et al. Rituximab identified as an independent risk factor for severe PJP: A case-control study. *PLoS ONE*. 2020;15(9):e0239042.
67. Yale SH, Limper AH. *Pneumocystis carinii* pneumonia in patients without acquired immunodeficiency syndrome: associated illness and prior corticosteroid therapy. *Mayo Clin Proc*. janv 1996;71(1):5-13.
68. Calero-Bernal ML, Martin-Garrido I, Donazar-Ezcurra M, Limper AH, Carmona EM. Intermittent Courses of Corticosteroids Also Present a Risk for *Pneumocystis* Pneumonia in Non-HIV Patients. *Can Respir J*. 2016;2016:2464791.
69. Baulier G, Issa N, Gabriel F, Accoceberry I, Camou F, Duffau P. Guidelines for prophylaxis of *Pneumocystis* pneumonia cannot rely solely on CD4-cell count in autoimmune and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*. juin 2018;36(3):490-3.
70. de Boer MGJ, Kroon FP, le Cessie S, de Fijter JW, van Dissel JT. Risk factors for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in kidney transplant recipients and appraisal of strategies for selective use of chemoprophylaxis. *Transpl Infect Dis*. déc 2011;13(6):559-69.
71. Iriart X, Challan Belval T, Fillaux J, Esposito L, Lavergne R-A, Cardeau-Desangles I, et al. Risk factors of *Pneumocystis* pneumonia in solid organ recipients in the era of the common use of posttransplantation prophylaxis. *Am J Transplant*. janv 2015;15(1):190-9.
72. Sepkowitz KA. Opportunistic infections in patients with and patients without Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Clin Infect Dis*. 15 avr 2002;34(8):1098-107.
73. Boonsarngsuk V, Sirilak S, Kiatboonsri S. Acute respiratory failure due to *Pneumocystis* pneumonia: outcome and prognostic factors. *Int J Infect Dis*. janv 2009;13(1):59-66.
74. Gaborit BJ, Tessoulin B, Lavergne R-A, Morio F, Sagan C, Canet E, et al. Outcome and prognostic factors of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised adults: a prospective observational study. *Ann Intensive Care*. 27 nov 2019;9(1):131.
75. Kageyama T, Furuta S, Ikeda K, Kagami S-I, Kashiwakuma D, Sugiyama T, et al. Prognostic factors of *Pneumocystis* pneumonia in patients with systemic autoimmune diseases. *PLoS ONE*. 2019;14(3):e0214324.

76. Guegan H, Robert-Gangneux F. Molecular diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia in immunocompromised patients. *Curr Opin Infect Dis.* 2019;32(4):314-21.
77. Haute Autorité de Santé. Évaluation des actes de diagnostic biologique de la pneumocystose (*Pneumocystis jirovecii*). *Argumentaire.* 2017;90.
78. Flori P, Belleste B, Durand F, Raberin H, Cazorla C, Hafid J, et al. Comparison between real-time PCR, conventional PCR and different staining techniques for diagnosing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia from bronchoalveolar lavage specimens. *J Med Microbiol.* juill 2004;53(Pt 7):603-7.
79. Moodley B, Tempia S, Freaux JA. Comparison of quantitative real-time PCR and direct immunofluorescence for the detection of *Pneumocystis jirovecii*. *PLoS ONE.* 2017;12(7):e0180589.
80. Roux P, Lavrard I, Poirot JL, Chouaid C, Denis M, Olivier JL, et al. Usefulness of PCR for detection of *Pneumocystis carinii* DNA. *J Clin Microbiol.* sept 1994;32(9):2324-6.
81. Azoulay É, Bergeron A, Chevret S, Bele N, Schlemmer B, Menotti J. Polymerase chain reaction for diagnosing *Pneumocystis* pneumonia in non-HIV immunocompromised patients with pulmonary infiltrates. *Chest.* mars 2009;135(3):655-61.
82. Maillet M, Maubon D, Brion JP, François P, Molina L, Stahl JP, et al. *Pneumocystis jirovecii* (Pj) quantitative PCR to differentiate Pj pneumonia from Pj colonization in immunocompromised patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* mars 2014;33(3):331-6.
83. Alanio A, Desoubeaux G, Sarfati C, Hamane S, Bergeron A, Azoulay E, et al. Real-time PCR assay-based strategy for differentiation between active *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Infect.* oct 2011;17(10):1531-7.
84. Fillaux J, Malvy S, Alvarez M, Fabre R, Cassaing S, Marchou B, et al. Accuracy of a routine real-time PCR assay for the diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Microbiol Methods.* oct 2008;75(2):258-61.
85. Robert-Gangneux F, Belaz S, Revest M, Tattevin P, Jouneau S, Decaux O, et al. Diagnosis of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in immunocompromised patients by real-time PCR: a 4-year prospective study. *J Clin Microbiol.* sept 2014;52(9):3370-6.
86. Damiani C, Le Gal S, Da Costa C, Virmaux M, Nevez G, Totet A. Combined quantification of pulmonary *Pneumocystis jirovecii* DNA and serum (1→3)-β-D-glucan for differential diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia and *Pneumocystis* colonization. *J Clin Microbiol.* oct 2013;51(10):3380-8.
87. Matsumura Y, Ito Y, Iinuma Y, Yasuma K, Yamamoto M, Matsushima A, et al. Quantitative real-time PCR and the (1→3)-β-D-glucan assay for differentiation between *Pneumocystis jirovecii* pneumonia and colonization. *Clin Microbiol Infect.* juin 2012;18(6):591-7.
88. Shimizu Y, Sunaga N, Dobashi K, Fueki M, Fueki N, Makino S, et al. Serum markers in interstitial pneumonia with and without *Pneumocystis jirovecii* colonization: a prospective study. *BMC Infect Dis.* 22 avr 2009;9:47.
89. Tasaka S, Hasegawa N, Kobayashi S, Yamada W, Nishimura T, Takeuchi T, et al. Serum indicators for the diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia. *Chest.* avr 2007;131(4):1173-80.

90. Esteves F, Calé SS, Badura R, de Boer MG, Maltez F, Calderón EJ, et al. Diagnosis of *Pneumocystis* pneumonia: evaluation of four serologic biomarkers. *Clin Microbiol Infect.* avr 2015;21(4):379.e1-10.
91. Nakamura H, Tateyama M, Tasato D, Haranaga S, Yara S, Higa F, et al. Clinical utility of serum beta-D-glucan and KL-6 levels in *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *Intern Med.* 2009;48(4):195-202.
92. Maschmeyer G, Helweg-Larsen J, Pagano L, Robin C, Cordonnier C, Schellongowski P, et al. ECIL guidelines for treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in non-HIV-infected haematology patients. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(9):2405-13.
93. Limper AH, Knox KS, Sarosi GA, Ampel NM, Bennett JE, Catanzaro A, et al. An official American Thoracic Society statement: Treatment of fungal infections in adult pulmonary and critical care patients. *Am J Respir Crit Care Med.* 1 janv 2011;183(1):96-128.
94. Masur H, Brooks JT, Benson CA, Holmes KK, Pau AK, Kaplan JE, et al. Prevention and treatment of opportunistic infections in HIV-infected adults and adolescents: Updated Guidelines from the Centers for Disease Control and Prevention, National Institutes of Health, and HIV Medicine Association of the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis.* mai 2014;58(9):1308-11.
95. EBPG Expert Group on Renal Transplantation. European best practice guidelines for renal transplantation. Section IV: Long-term management of the transplant recipient. IV.7.1 Late infections. *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Nephrol Dial Transplant.* 2002;17 Suppl 4:36-9.
96. Maertens J, Cesaro S, Maschmeyer G, Einsele H, Donnelly JP, Alanio A, et al. ECIL guidelines for preventing *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with haematological malignancies and stem cell transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 1 sept 2016;71(9):2397-404.
97. Liebling M, Rubio E, le S. Prophylaxis for *Pneumocystis jirovecii* pneumonia: is it a necessity in pulmonary patients on high-dose, chronic corticosteroid therapy without AIDS? *Expert Rev Respir Med.* avr 2015;9(2):171-81.
98. Park JW, Curtis JR, Moon J, Song YW, Kim S, Lee EB. Prophylactic effect of trimethoprim-sulfamethoxazole for *Pneumocystis* pneumonia in patients with rheumatic diseases exposed to prolonged high-dose glucocorticoids. *Ann Rheum Dis.* 2018;77(5):644-9.
99. Rudmann DG, Preston AM, Moore MW, Beck JM. Susceptibility to *Pneumocystis carinii* in mice is dependent on simultaneous deletion of IFN-gamma and type 1 and 2 TNF receptor genes. *J Immunol.* 1 juill 1998;161(1):360-6.
100. Pérez FJ, Iturra PA, Ponce CA, Magne F, Garcia-Angulo V, Vargas SL. Niflumic Acid Reverses Airway Mucus Excess and Improves Survival in the Rat Model of Steroid-Induced *Pneumocystis* Pneumonia. *Front Microbiol.* 2019;10:1522.
101. Limper AH, Offord KP, Smith TF, Martin WJ. *Pneumocystis carinii* pneumonia. Differences in lung parasite number and inflammation in patients with and without AIDS. *Am Rev Respir Dis.* nov 1989;140(5):1204-9.
102. Achenbach CJ, Harrington RD, Dhanireddy S, Crane HM, Casper C, Kitahata MM. Paradoxical Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in HIV-Infected Patients Treated With

- Combination Antiretroviral Therapy After AIDS-Defining Opportunistic Infection. *Clin Infect Dis*. 1 févr 2012;54(3):424-33.
103. Mok HP, Hart E, Venkatesan P. Early development of immune reconstitution inflammatory syndrome related to *Pneumocystis pneumonia* after antiretroviral therapy. *Int J STD AIDS*. avr 2014;25(5):373-7.
 104. Hernandez-Novoa B, Bishop L, Logun C, Munson PJ, Enekave E, Rangel ZG, et al. Immune responses to *Pneumocystis murina* are robust in healthy mice but largely absent in CD40 ligand-deficient mice. *J Leukoc Biol*. août 2008;84(2):420-30.
 105. Linke M, Ashbaugh A, Demland J, Koch J, Tanaka R, Walzer P. Resolution of *Pneumocystis murina* infection following withdrawal of corticosteroid induced immunosuppression. *Microb Pathog*. janv 2006;40(1):15-22.
 106. Eddens T, Elsegeiny W, Nelson MP, Horne W, Campfield BT, Steele C, et al. Eosinophils Contribute to Early Clearance of *Pneumocystis murina* Infection. *J Immunol*. 1 juill 2015;195(1):185-93.
 107. Beck JM, Preston AM, Wilcoxon SE, Morris SB, White ES, Paine R. *Pneumocystis pneumonia* increases the susceptibility of mice to sublethal hyperoxia. *Infect Immun*. oct 2003;71(10):5970-8.
 108. Wright TW, Gigliotti F, Finkelstein JN, McBride JT, An CL, Harmsen AG. Immune-mediated inflammation directly impairs pulmonary function, contributing to the pathogenesis of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *J Clin Invest*. nov 1999;104(9):1307-17.
 109. Wright TW, Notter RH, Wang Z, Harmsen AG, Gigliotti F. Pulmonary inflammation disrupts surfactant function during *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infect Immun*. févr 2001;69(2):758-64.
 110. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 23 janv 2018;9(6):7204-18.
 111. Granger V, Chaisemartin L de, Chollet-Martin S. La pêche miraculeuse des filets du neutrophile. *Med Sci (Paris)*. 1 mai 2014;30(5):544-9.
 112. Branzk N, Papayannopoulos V. Molecular mechanisms regulating NETosis in infection and disease. *Semin Immunopathol*. juill 2013;35(4):513-30.
 113. Hunter P. The inflammation theory of disease. The growing realization that chronic inflammation is crucial in many diseases opens new avenues for treatment. *EMBO Rep*. 6 nov 2012;13(11):968-70.
 114. Fukata M, Chen A, Vamadevan AS, Cohen J, Breglio K, Krishnareddy S, et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology*. déc 2007;133(6):1869-81.
 115. Michaud M, Balardy L, Moulis G, Gaudin C, Peyrot C, Vellas B, et al. Proinflammatory Cytokines, Aging, and Age-Related Diseases. *Journal of the American Medical Directors Association*. 1 déc 2013;14(12):877-82.

116. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol.* mars 2006;6(3):173-82.
117. Sibille Y, Marchandise FX. Pulmonary immune cells in health and disease: polymorphonuclear neutrophils. *Eur Respir J.* nov 1993;6(10):1529-43.
118. Okin D, Medzhitov R. Evolution of Inflammatory Diseases. *Curr Biol.* 11 sept 2012;22(17):R733-40.
119. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell.* 19 mars 2010;140(6):871-82.
120. Gyawali B, Ramakrishna K, Dhamoon AS. Sepsis: The evolution in definition, pathophysiology, and management. *SAGE Open Med.* 2019;7:2050312119835043.
121. Remick DG. Pathophysiology of Sepsis. *Am J Pathol.* mai 2007;170(5):1435-44.
122. Angus DC, van der Poll T. Severe Sepsis and Septic Shock. *New England Journal of Medicine.* 29 août 2013;369(9):840-51.
123. Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 24 juill 2008;454(7203):428-35.
124. Buckley CD, Gilroy DW, Serhan CN. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. *Immunity.* 20 mars 2014;40(3):315-27.
125. Feehan KT, Gilroy DW. Is Resolution the End of Inflammation? *Trends Mol Med.* 2019;25(3):198-214.
126. Fullerton JN, Gilroy DW. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. *Nat Rev Drug Discov.* 2016;15(8):551-67.
127. Corthay A. How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol.* oct 2009;70(4):326-36.
128. Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, Liotta F, Annunziato F. T helper cells plasticity in inflammation. *Cytometry A.* janv 2014;85(1):36-42.
129. Gagliani N, Huber S. Basic Aspects of T Helper Cell Differentiation. *Methods Mol Biol.* 2017;1514:19-30.
130. Schmitt N, Ueno H. Regulation of Human Helper T Cell Subset Differentiation by Cytokines. *Curr Opin Immunol.* juin 2015;34:130-6.
131. Bär E, Whitney PG, Moor K, Reis e Sousa C, LeibundGut-Landmann S. IL-17 Regulates Systemic Fungal Immunity by Controlling the Functional Competence of NK Cells. *Immunity.* 16 janv 2014;40(1):117-27.
132. Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009;27:485-517.
133. Cui G. TH9, TH17, and TH22 Cell Subsets and Their Main Cytokine Products in the Pathogenesis of Colorectal Cancer. *Front Oncol.* 2019;9:1002.
134. Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity.* 16 oct 2014;41(4):529-42.

135. Leung S, Liu X, Fang L, Chen X, Guo T, Zhang J. The cytokine milieu in the interplay of pathogenic Th1/Th17 cells and regulatory T cells in autoimmune disease. *Cell Mol Immunol.* mai 2010;7(3):182-9.
136. Romano M, Fanelli G, Albany CJ, Giganti G, Lombardi G. Past, Present, and Future of Regulatory T Cell Therapy in Transplantation and Autoimmunity. *Front Immunol.* 2019;10:43.
137. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nat Rev Immunol.* nov 2007;7(11):875-88.
138. Talaat RM, Mohamed SF, Bassyouni IH, Raouf AA. Th1/Th2/Th17/Treg cytokine imbalance in systemic lupus erythematosus (SLE) patients: Correlation with disease activity. *Cytokine.* 1 avr 2015;72(2):146-53.
139. Hirahara K, Nakayama T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol.* avr 2016;28(4):163-71.
140. Saunders KA, Raine T, Cooke A, Lawrence CE. Inhibition of Autoimmune Type 1 Diabetes by Gastrointestinal Helminth Infection. *Infection and Immunity.* 1 janv 2007;75(1):397-407.
141. Cooke A, Tonks P, Jones FM, O'Shea H, Hutchings P, Fulford AJ, et al. Infection with *Schistosoma mansoni* prevents insulin dependent diabetes mellitus in non-obese diabetic mice. *Parasite Immunol.* avr 1999;21(4):169-76.
142. Specht S, Ruiz DF, Dubben B, Deininger S, Hoerauf A. Filaria-induced IL-10 suppresses murine cerebral malaria. *Microbes Infect.* août 2010;12(8-9):635-42.
143. Wynn TA. Fibrotic disease and the T(H)1/T(H)2 paradigm. *Nat Rev Immunol.* août 2004;4(8):583-94.
144. Ong CJ, Ip S, Teh SJ, Wong C, Jirik FR, Grusby MJ, et al. A role for T helper 2 cells in mediating skin fibrosis in tight-skin mice. *Cell Immunol.* 25 août 1999;196(1):60-8.
145. Deenick EK, Tangye SG. Autoimmunity: IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. *Immunol Cell Biol.* oct 2007;85(7):503-5.
146. Gajewski TF, Joyce J, Fitch FW. Antiproliferative effect of IFN-gamma in immune regulation. III. Differential selection of TH1 and TH2 murine helper T lymphocyte clones using recombinant IL-2 and recombinant IFN-gamma. *J Immunol.* 1 juill 1989;143(1):15-22.
147. Mosmann TR, Moore KW. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today.* mars 1991;12(3):A49-53.
148. Serhan CN. The resolution of inflammation: the devil in the flask and in the details. *FASEB J.* mai 2011;25(5):1441-8.
149. Serhan CN, Chiang N, Dalli J, Levy BD. Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 30 oct 2014;7(2):a016311.
150. Xu Z-Z, Zhang L, Liu T, Park JY, Berta T, Yang R, et al. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. *Nat Med.* mai 2010;16(5):592-7, 1p following 597.

151. Hornych AF, Borel JP. Prostaglandines, thromboxanes et leucotriènes. *Biologie et Clinique. Applications en cardiologie, pneumologie, néphrologie et gériatrie*. Frison Roche; 2018.
152. Serhan CN, Petasis NA. Resolvins and protectins in inflammation resolution. *Chem Rev*. 12 oct 2011;111(10):5922-43.
153. Chan MM-Y, Moore AR. Resolution of inflammation in murine autoimmune arthritis is disrupted by cyclooxygenase-2 inhibition and restored by prostaglandin E2-mediated lipoxin A4 production. *J Immunol*. 1 juin 2010;184(11):6418-26.
154. Loynes CA, Lee JA, Robertson AL, Steel MJ, Ellett F, Feng Y, et al. PGE2 production at sites of tissue injury promotes an anti-inflammatory neutrophil phenotype and determines the outcome of inflammation resolution in vivo. *Sci Adv*. 2018;4(9):ear8320.
155. Serhan CN, Chiang N, Van Dyke TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. *Nat Rev Immunol*. mai 2008;8(5):349-61.
156. Serhan CN, Dalli J, Colas RA, Winkler JW, Chiang N. Protectins and maresins: New pro-resolving families of mediators in acute inflammation and resolution bioactive metabolome. *Biochim Biophys Acta*. avr 2015;1851(4):397-413.
157. Levy BD, Clish CB, Schmidt B, Gronert K, Serhan CN. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. *Nat Immunol*. juill 2001;2(7):612-9.
158. Maderna P, Godson C. Taking insult from injury: Lipoxins and lipoxin receptor agonists and phagocytosis of apoptotic cells. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*. 1 sept 2005;73(3):179-87.
159. Sun Y-P, Oh SF, Uddin J, Yang R, Gotlinger K, Campbell E, et al. Resolvin D1 and its aspirin-triggered 17R epimer. Stereochemical assignments, anti-inflammatory properties, and enzymatic inactivation. *J Biol Chem*. 30 mars 2007;282(13):9323-34.
160. Serhan CN, Dalli J, Karamnov S, Choi A, Park C-K, Xu Z-Z, et al. Macrophage proresolving mediator maresin 1 stimulates tissue regeneration and controls pain. *FASEB J*. avr 2012;26(4):1755-65.
161. Liao Z, Dong J, Wu W, Yang T, Wang T, Guo L, et al. Resolvin D1 attenuates inflammation in lipopolysaccharide-induced acute lung injury through a process involving the PPAR γ /NF- κ B pathway. *Respir Res*. 2 déc 2012;13:110.
162. Gozes I. *Neuroprotection in Alzheimer's Disease*. Academic Press; 2016. 344.
163. Kytikova OY, Perelman JM, Novgorodtseva TP, Denisenko YK, Kolosov VP, Antonyuk MV, et al. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors as a Therapeutic Target in Asthma. *PPAR Res*. 2020;2020:8906968.
164. Serhan CN, Krishnamoorthy S, Recchiuti A, Chiang N. Novel Anti-Inflammatory -- Pro-Resolving Mediators and Their Receptors. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(6):629-47.
165. Duvall MG, Levy BD. DHA- and EPA-derived resolvins, protectins, and maresins in airway inflammation. *Eur J Pharmacol*. 15 août 2016;785:144-55.

166. Serhan CN, Chiang N, Dalli J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. *Semin Immunol.* mai 2015;27(3):200-15.
167. Russell CD, Schwarze J. The role of pro-resolution lipid mediators in infectious disease. *Immunology.* févr 2014;141(2):166-73.
168. Shryock N, McBerry C, Salazar Gonzalez RM, Janes S, Costa FTM, Aliberti J. Lipoxin A₄ and 15-epi-lipoxin A₄ protect against experimental cerebral malaria by inhibiting IL-12/IFN- γ in the brain. *PLoS ONE.* 2013;8(4):e61882.
169. Molina-Berríos A, Campos-Estrada C, Henriquez N, Faúndez M, Torres G, Castillo C, et al. Protective role of acetylsalicylic acid in experimental *Trypanosoma cruzi* infection: evidence of a 15-epi-lipoxin A₄-mediated effect. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(4):e2173.
170. Shirey KA, Lai W, Pletneva LM, Karp CL, Divanovic S, Blanco JCG, et al. Role of the lipoxygenase pathway in RSV-induced alternatively activated macrophages leading to resolution of lung pathology. *Mucosal Immunol.* mai 2014;7(3):549-57.
171. Machado FS, Johndrow JE, Esper L, Dias A, Bafica A, Serhan CN, et al. Anti-inflammatory actions of lipoxin A₄ and aspirin-triggered lipoxin are SOCS-2 dependent. *Nat Med.* mars 2006;12(3):330-4.
172. Seki H, Fukunaga K, Arita M, Arai H, Nakanishi H, Taguchi R, et al. The anti-inflammatory and proresolving mediator resolvin E1 protects mice from bacterial pneumonia and acute lung injury. *J Immunol.* 15 janv 2010;184(2):836-43.
173. Morita M, Kuba K, Ichikawa A, Nakayama M, Katahira J, Iwamoto R, et al. The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. *Cell.* 28 mars 2013;153(1):112-25.
174. Chiang N, Fredman G, Bäckhed F, Oh SF, Vickery T, Schmidt BA, et al. Infection regulates pro-resolving mediators that lower antibiotic requirements. *Nature.* 25 avr 2012;484(7395):524-8.
175. Bafica A, Scanga CA, Serhan C, Machado F, White S, Sher A, et al. Host control of *Mycobacterium tuberculosis* is regulated by 5-lipoxygenase-dependent lipoxin production. *J Clin Invest.* juin 2005;115(6):1601-6.
176. Aliberti J, Serhan C, Sher A. Parasite-induced lipoxin A₄ is an endogenous regulator of IL-12 production and immunopathology in *Toxoplasma gondii* infection. *J Exp Med.* 4 nov 2002;196(9):1253-62.
177. Aliberti J, Hieny S, Reis e Sousa C, Serhan CN, Sher A. Lipoxin-mediated inhibition of IL-12 production by DCs: a mechanism for regulation of microbial immunity. *Nat Immunol.* janv 2002;3(1):76-82.
178. Recchiuti A, Serhan CN. Pro-Resolving Lipid Mediators (SPMs) and Their Actions in Regulating miRNA in Novel Resolution Circuits in Inflammation. *Front Immunol.* 2012;3:298.
179. Brancaleone V, Gobetti T, Cenac N, le Faouder P, Colom B, Flower RJ, et al. A vasculo-protective circuit centered on lipoxin A₄ and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A₄ operative in murine microcirculation. *Blood.* 25 juill 2013;122(4):608-17.

180. Fierro IM, Colgan SP, Bernasconi G, Petasis NA, Clish CB, Arita M, et al. Lipoxin A4 and aspirin-triggered 15-epi-lipoxin A4 inhibit human neutrophil migration: comparisons between synthetic 15 epimers in chemotaxis and transmigration with microvessel endothelial cells and epithelial cells. *J Immunol.* 1 mars 2003;170(5):2688-94.
181. Bhavsar PK, Levy BD, Hew MJ, Pfeffer MA, Kazani S, Israel E, et al. Corticosteroid suppression of lipoxin A4 and leukotriene B4 from alveolar macrophages in severe asthma. *Respir Res.* 2010;11(1):71.
182. Kim N, Thatcher TH, Sime PJ, Phipps RP. Corticosteroids inhibit anti-IgE activities of specialized proresolving mediators on B cells from asthma patients. *JCI Insight.* 09 2017;2(3):e88588.
183. Gupta C, Katsumata M, Goldman AS, Herold R, Piddington R. Glucocorticoid-induced phospholipase A2-inhibitory proteins mediate glucocorticoid teratogenicity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* févr 1984;81(4):1140-3.
184. Nakano T, Ohara O, Teraoka H, Arita H. Glucocorticoids suppress group II phospholipase A2 production by blocking mRNA synthesis and post-transcriptional expression. *J Biol Chem.* 25 juill 1990;265(21):12745-8.
185. Calder PC. N-3 polyunsaturated fatty acids and inflammation: from molecular biology to the clinic. *Lipids.* avr 2003;38(4):343-52.
186. Kelley DS, Taylor PC, Nelson GJ, Mackey BE. Arachidonic acid supplementation enhances synthesis of eicosanoids without suppressing immune functions in young healthy men. *Lipids.* févr 1998;33(2):125-30.
187. Trebble TM, Wootton SA, Miles EA, Mullee M, Arden NK, Ballinger AB, et al. Prostaglandin E2 production and T cell function after fish-oil supplementation: response to antioxidant cosupplementation. *Am J Clin Nutr.* sept 2003;78(3):376-82.
188. Kelley DS, Taylor PC, Nelson GJ, Schmidt PC, Ferretti A, Erickson KL, et al. Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men. *Lipids.* avr 1999;34(4):317-24.
189. Souza PR, Marques RM, Gomez EA, Colas RA, De Matteis R, Zak A, et al. Enriched Marine Oil Supplements Increase Peripheral Blood Specialized Pro-Resolving Mediators Concentrations and Reprogram Host Immune Responses: A Randomized Double-Blind Placebo-Controlled Study. *Circ Res.* 3 janv 2020;126(1):75-90.
190. Ierna M, Kerr A, Scales H, Berge K, Griinari M. Supplementation of diet with krill oil protects against experimental rheumatoid arthritis. *BMC Musculoskelet Disord.* 29 juin 2010;11:136.
191. Volker DH, FitzGerald PE, Garg ML. The eicosapentaenoic to docosahexaenoic acid ratio of diets affects the pathogenesis of arthritis in Lew/SSN rats. *J Nutr.* mars 2000;130(3):559-65.
192. Qureshi MH, Harmsen AG, Garvy BA. IL-10 modulates host responses and lung damage induced by *Pneumocystis carinii* infection. *J Immunol.* 15 janv 2003;170(2):1002-9.
193. Rong H-M, Qian X-J, Zhang C, Li T, Tong Z-H. IL-17 Inversely Correlated with IL-10 via the STAT3 Gene in *Pneumocystis*-Infected Mice. *Mediators Inflamm.* 2019;2019:6750861.

194. Carmona EM, Vassallo R, Vuk-Pavlovic Z, Standing JE, Kottom TJ, Limper AH. *Pneumocystis* cell wall beta-glucans induce dendritic cell costimulatory molecule expression and inflammatory activation through a Fas-Fas ligand mechanism. *J Immunol.* 1 juill 2006;177(1):459-67.
195. Kottom TJ, Hebrink DM, Limper AH. Binding of *Pneumocystis carinii* to the lung epithelial cell receptor HSPA5 (GRP78). *J Med Microbiol.* déc 2018;67(12):1772-7.
196. Kottom TJ, Hebrink DM, Jenson PE, Marsolek PL, Wüthrich M, Wang H, et al. Dectin-2 Is a C-Type Lectin Receptor that Recognizes *Pneumocystis* and Participates in Innate Immune Responses. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2018;58(2):232-40.
197. Lebron F, Vassallo R, Puri V, Limper AH. *Pneumocystis carinii* cell wall beta-glucans initiate macrophage inflammatory responses through NF-kappaB activation. *J Biol Chem.* 4 juill 2003;278(27):25001-8.
198. Hahn PY, Evans SE, Kottom TJ, Standing JE, Pagano RE, Limper AH. *Pneumocystis carinii* cell wall beta-glucan induces release of macrophage inflammatory protein-2 from alveolar epithelial cells via a lactosylceramide-mediated mechanism. *J Biol Chem.* 17 janv 2003;278(3):2043-50.
199. Limper AH, Lebron F, Evans SE, Hahn RY. *Pneumocystis carinii*: cell wall beta-glucan-mediated pulmonary inflammation. *J Eukaryot Microbiol.* 2003;50 Suppl:646.
200. Swain SD, Meissner N, Han S, Harmsen A. *Pneumocystis* Infection in an Immunocompetent Host Can Promote Collateral Sensitization to Respiratory Antigens ∇ . *Infect Immun.* mai 2011;79(5):1905-14.
201. Shellito JE, Tate C, Ruan S, Kolls J. Murine CD4+ T lymphocyte subsets and host defense against *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis.* juin 2000;181(6):2011-7.
202. Ripamonti C, Bishop LR, Kovacs JA. Pulmonary Interleukin-17-Positive Lymphocytes Increase during *Pneumocystis murina* Infection but Are Not Required for Clearance of *Pneumocystis*. *Infect Immun.* 2017;85(7).
203. McKinley L, Logar AJ, McAllister F, Zheng M, Steele C, Kolls JK. Regulatory T cells dampen pulmonary inflammation and lung injury in an animal model of *Pneumocystis* pneumonia. *J Immunol.* 1 nov 2006;177(9):6215-26.
204. Garvy BA, Wiley JA, Gigliotti F, Harmsen AG. Protection against *Pneumocystis carinii* pneumonia by antibodies generated from either T helper 1 or T helper 2 responses. *Infect Immun.* déc 1997;65(12):5052-6.
205. Meissner NN, Swain S, Tighe M, Harmsen A, Harmsen A. Role of type I IFNs in pulmonary complications of *Pneumocystis murina* infection. *J Immunol.* 1 mai 2005;174(9):5462-71.
206. Evans HM, Bryant GL, Garvy BA. The life cycle stages of *Pneumocystis murina* have opposing effects on the immune response to this opportunistic, fungal pathogen. *Infect Immun.* 2016;84(11):3195-205.
207. Steele C, Marrero L, Swain S, Harmsen AG, Zheng M, Brown GD, et al. Alveolar macrophage-mediated killing of *Pneumocystis carinii* f. sp. muris involves molecular recognition by the Dectin-1 beta-glucan receptor. *J Exp Med.* 1 déc 2003;198(11):1677-88.

208. Limper AH, Hoyte JS, Standing JE. The role of alveolar macrophages in *Pneumocystis carinii* degradation and clearance from the lung. *J Clin Invest*. 1 mai 1997;99(9):2110-7.
209. Deckman JM, Kurkjian CJ, McGillis JP, Cory TJ, Birket SE, Schutzman LM, et al. *Pneumocystis* infection alters the activation state of pulmonary macrophages. *Immunobiology*. 2017;222(2):188-97.
210. Nandakumar V, Hebrink D, Jenson P, Kottom T, Limper AH. Differential Macrophage Polarization from *Pneumocystis* in Immunocompetent and Immunosuppressed Hosts: Potential Adjunctive Therapy during Pneumonia. *Infect Immun*. 2017;85(3).
211. McAllister F, Mc Allister F, Steele C, Zheng M, Young E, Shellito JE, et al. T cytotoxic-1 CD8+ T cells are effector cells against *Pneumocystis* in mice. *J Immunol*. 15 janv 2004;172(2):1132-8.
212. McAllister F, Steele C, Zheng M, Shellito JE, Kolls JK. In Vitro Effector Activity of *Pneumocystis murina*-Specific T-Cytotoxic-1 CD8+ T Cells: Role of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor. *Infect Immun*. nov 2005;73(11):7450-7.
213. Kelly MN, Zheng M, Ruan S, Kolls J, D'Souza A, Shellito JE. Memory CD4+ T cells are required for optimal NK cell effector functions against the opportunistic fungal pathogen *Pneumocystis murina*. *J Immunol*. 1 janv 2013;190(1):285-95.
214. Ezekowitz RA, Williams DJ, Koziel H, Armstrong MY, Warner A, Richards FF, et al. Uptake of *Pneumocystis carinii* mediated by the macrophage mannose receptor. *Nature*. 9 mai 1991;351(6322):155-8.
215. Cirillo E, Giardino G, Gallo V, D'Assante R, Grasso F, Romano R, et al. Severe combined immunodeficiency--an update. *Ann N Y Acad Sci*. nov 2015;1356:90-106.
216. Malamut G, Verkarre V, Brousse N, Cellier C. [Gastrointestinal diseases in primary immunodeficiency disorders]. *Gastroenterol Clin Biol*. oct 2007;31(10):844-53.
217. Phair J, Muñoz A, Detels R, Kaslow R, Rinaldo C, Saah A. The risk of *Pneumocystis carinii* pneumonia among men infected with human immunodeficiency virus type 1. Multicenter AIDS Cohort Study Group. *N Engl J Med*. 18 janv 1990;322(3):161-5.
218. Fei MW, Kim EJ, Sant CA, Jarlsberg LG, Davis JL, Swartzman A, et al. Predicting mortality from HIV-associated *Pneumocystis* pneumonia at illness presentation: an observational cohort study. *Thorax*. déc 2009;64(12):1070-6.
219. Walzer PD, Evans HER, Copas AJ, Edwards SG, Grant AD, Miller RF. Early Predictors of Mortality from *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia in HIV-Infected Patients: 1985–2006. *Clin Infect Dis*. 15 févr 2008;46(4):625-33.
220. Dworkin MS, Hanson DL, Navin TR. Survival of patients with AIDS, after diagnosis of *Pneumocystis carinii* pneumonia, in the United States. *J Infect Dis*. 1 mai 2001;183(9):1409-12.
221. Beck JM, Newbury RL, Palmer BE, Warnock ML, Byrd PK, Kaltreider HB. Role of CD8+ lymphocytes in host defense against *Pneumocystis carinii* in mice. *J Lab Clin Med*. nov 1996;128(5):477-87.

222. Steele C, Zheng M, Young E, Marrero L, Shellito JE, Kolls JK. Increased host resistance against *Pneumocystis carinii* pneumonia in gammadelta T-cell-deficient mice: protective role of gamma interferon and CD8(+) T cells. *Infect Immun.* sept 2002;70(9):5208-15.
223. Rudner XL, Happel KI, Young EA, Shellito JE. Interleukin-23 (IL-23)-IL-17 cytokine axis in murine *Pneumocystis carinii* infection. *Infect Immun.* juin 2007;75(6):3055-61.
224. Barzaghi F, Passerini L, Bacchetta R. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x-linked syndrome: a paradigm of immunodeficiency with autoimmunity. *Front Immunol.* 2012;3:211.
225. Kurkjian C, Hollifield M, Lines JL, Rogosky A, Empey KM, Qureshi M, et al. Alveolar macrophages in neonatal mice are inherently unresponsive to *Pneumocystis murina* infection. *Infect Immun.* août 2012;80(8):2835-46.
226. Lund FE, Hollifield M, Schuer K, Lines JL, Randall TD, Garvy BA. B cells are required for generation of protective effector and memory CD4 cells in response to *Pneumocystis* lung infection. *J Immunol.* 15 mai 2006;176(10):6147-54.
227. Swain SD, Meissner NN, Harmsen AG. CD8 T cells modulate CD4 T-cell and eosinophil-mediated pulmonary pathology in *Pneumocystis* pneumonia in B-cell-deficient mice. *Am J Pathol.* févr 2006;168(2):466-75.
228. O'Donnell WJ, Pieciak W, Chertow GM, Sanabria J, Lahive KC. Clearance of *Pneumocystis carinii* cysts in acute *P. carinii* pneumonia: assessment by serial sputum induction. *Chest.* nov 1998;114(5):1264-8.
229. Kim YH, Kim JY, Kim DH, Ko Y, Choi JY, Shin S, et al. *Pneumocystis* pneumonia occurrence and prophylaxis duration in kidney transplant recipients according to perioperative treatment with rituximab. *BMC Nephrol.* 11 2020;21(1):93.
230. Levy J, Espanol-Boren T, Thomas C, Fischer A, Tovo P, Bordigoni P, et al. Clinical spectrum of X-linked hyper-IgM syndrome. *J Pediatr.* juill 1997;131(1 Pt 1):47-54.
231. Davies EG, Thrasher AJ. Update on the hyper immunoglobulin M syndromes. *Br J Haematol.* avr 2010;149(2):167-80.
232. Lund FE, Schuer K, Hollifield M, Randall TD, Garvy BA. Clearance of *Pneumocystis carinii* in mice is dependent on B cells but not on *P. carinii*-specific antibody. *J Immunol.* 1 août 2003;171(3):1423-30.
233. Alibrahim A, Lepore M, Lierl M, Filipovich A, Assa'ad A. *Pneumocystis carinii* pneumonia in an infant with X-linked agammaglobulinemia. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 1 avr 1998;101(4):552-3.
234. Shillitoe B, Gennery A. X-Linked Agammaglobulinaemia: Outcomes in the modern era. *Clin Immunol.* 2017;183:54-62.
235. van de Veen W, Krätz CE, McKenzie CI, Aui PM, Neumann J, van Noesel CJM, et al. Impaired memory B-cell development and antibody maturation with a skewing toward IgE in patients with STAT3 hyper-IgE syndrome. *Allergy.* 2019;74(12):2394-405.

236. Chandesris M-O, Melki I, Natividad A, Puel A, Fieschi C, Yun L, et al. Autosomal Dominant STAT3 Deficiency and Hyper-IgE Syndrome Molecular, Cellular, and Clinical Features From a French National Survey. *Medicine (Baltimore)*. juill 2012;91(4):e1-19.
237. Opata MM, Hollifield ML, Lund FE, Randall TD, Dunn R, Garvy BA, et al. B Lymphocytes Are Required during the Early Priming of CD4+ T Cells for Clearance of *Pneumocystis* Infection in Mice. *J Immunol*. 15 juill 2015;195(2):611-20.
238. Linton P-J, Bautista B, Biederman E, Bradley ES, Harbertson J, Kondrack RM, et al. Costimulation via OX40L Expressed by B Cells Is Sufficient to Determine the Extent of Primary CD4 Cell Expansion and Th2 Cytokine Secretion In Vivo. *J Exp Med*. 7 avr 2003;197(7):875-83.
239. Rong H-M, Li T, Zhang C, Wang D, Hu Y, Zhai K, et al. IL-10-producing B cells regulate Th1/Th17-cell immune responses in *Pneumocystis* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 01 2019;316(1):L291-301.
240. Desjardins A, Coignard-Biehler H, Mahlaoui N, Frange P, Bougnoux M-E, Blanche S, et al. Infections fongiques et granulomateuse septique chronique - De la physiopathologie aux nouvelles perspectives thérapeutiques. *Med Sci (Paris)*. 1 nov 2012;28(11):963-9.
241. Swain SD, Wright TW, Degel PM, Gigliotti F, Harmsen AG. Neither neutrophils nor reactive oxygen species contribute to tissue damage during *Pneumocystis* pneumonia in mice. *Infect Immun*. oct 2004;72(10):5722-32.
242. Koike T, Harigai M, Inokuma S, Ishiguro N, Ryu J, Takeuchi T, et al. Postmarketing surveillance of safety and effectiveness of etanercept in Japanese patients with rheumatoid arthritis. *Mod Rheumatol*. août 2011;21(4):343-51.
243. Katsuyama T, Saito K, Kubo S, Nawata M, Tanaka Y. Prophylaxis for *Pneumocystis* pneumonia in patients with rheumatoid arthritis treated with biologics, based on risk factors found in a retrospective study. *Arthritis Res Ther*. 5 févr 2014;16(1):R43.
244. Porta C, Rimoldi M, Raes G, Brys L, Ghezzi P, Di Liberto D, et al. Tolerance and M2 (alternative) macrophage polarization are related processes orchestrated by p50 nuclear factor κ B. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1 sept 2009;106(35):14978-83.
245. Lawrence T. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. déc 2009;1(6):a001651.
246. Wang J, Gigliotti F, Maggirwar S, Johnston C, Finkelstein JN, Wright TW. *Pneumocystis carinii* Activates the NF- κ B Signaling Pathway in Alveolar Epithelial Cells. *Infect Immun*. mai 2005;73(5):2766-77.
247. Wang J, Gigliotti F, Bhagwat SP, George TC, Wright TW. Immune modulation with sulfasalazine attenuates immunopathogenesis but enhances macrophage-mediated fungal clearance during *Pneumocystis* pneumonia. *PLoS Pathog*. 19 août 2010;6(8):e1001058.
248. Perez-Nazario N, Rangel-Moreno J, O'Reilly MA, Pasparakis M, Gigliotti F, Wright TW. Selective ablation of lung epithelial IKK2 impairs pulmonary Th17 responses and delays the clearance of *Pneumocystis*. *J Immunol*. 1 nov 2013;191(9):4720-30.

249. Salt BH, Niemela JE, Pandey R, Hanson EP, Deering RP, Quinones R, et al. IKBKG (nuclear factor-kappa B essential modulator) mutation can be associated with opportunistic infection without impairing Toll-like receptor function. *J Allergy Clin Immunol.* avr 2008;121(4):976-82.
250. Warschkau H, Yu H, Kiderlen AF. Activation and suppression of natural cellular immune functions by *Pneumocystis carinii*. *Immunobiology.* févr 1998;198(4):343-60.
251. Dickenmann MJ, Tamm M, Tsinalis D, Binet I, Thiel G, Steiger J. Blood eosinophilia in tacrolimus-treated patients: an indicator of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Transplantation.* 27 nov 1999;68(10):1606-8.
252. Jose DG, Gatti RA, Good RA. Eosinophilia with *Pneumocystis carinii* pneumonia and immune deficiency syndromes. *J Pediatr.* nov 1971;79(5):748-54.
253. Fleury-Feith J, Van Nhieu JT, Picard C, Escudier E, Bernaudin JF. Bronchoalveolar lavage eosinophilia associated with *Pneumocystis carinii* pneumonitis in AIDS patients. Comparative study with non-AIDS patients. *Chest.* juin 1989;95(6):1198-201.
254. Zhang Z-Q, Wang J, Hoy Z, Keegan A, Bhagwat S, Gigliotti F, et al. Neither classical nor alternative macrophage activation is required for *Pneumocystis* clearance during immune reconstitution inflammatory syndrome. *Infect Immun.* déc 2015;83(12):4594-603.
255. Beck JM, Warnock ML, Curtis JL, Sniezek MJ, Arraj-Peffer SM, Kaltreider HB, et al. Inflammatory responses to *Pneumocystis carinii* in mice selectively depleted of helper T lymphocytes. *Am J Respir Cell Mol Biol.* août 1991;5(2):186-97.
256. Bhagwat SP, Wright TW, Gigliotti F. Anti-CD3 antibody decreases inflammation and improves outcome in a murine model of *Pneumocystis* pneumonia. *J Immunol.* 1 janv 2010;184(1):497-502.
257. Roths JB, Sidman CL. Both immunity and hyperresponsiveness to *Pneumocystis carinii* result from transfer of CD4+ but not CD8+ T cells into severe combined immunodeficiency mice. *J Clin Invest.* août 1992;90(2):673-8.
258. Bhagwat SP, Gigliotti F, Xu H, Wright TW. Contribution of T cell subsets to the pathophysiology of *Pneumocystis*-related immunorestitution disease. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* déc 2006;291(6):L1256-1266.
259. Ruan S, McKinley L, Zheng M, Rudner X, D'Souza A, Kolls JK, et al. Interleukin-12 and host defense against murine *Pneumocystis* pneumonia. *Infect Immun.* mai 2008;76(5):2130-7.
260. Kolls JK, Habetz S, Shean MK, Vazquez C, Brown JA, Lei D, et al. IFN- γ and CD8+ T Cells Restore Host Defenses Against *Pneumocystis carinii* in Mice Depleted of CD4+ T Cells. *The Journal of Immunology.* 1 mars 1999;162(5):2890-4.
261. Beck JM, Liggitt HD, Brunette EN, Fuchs HJ, Shellito JE, Debs RJ. Reduction in intensity of *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice by aerosol administration of gamma interferon. *Infect Immun.* nov 1991;59(11):3859-62.
262. Iturra PA, Rojas DA, Pérez FJ, Méndez A, Ponce CA, Bonilla P, et al. Progression of Type 2 Helper T Cell-Type Inflammation and Airway Remodeling in a Rodent Model of Naturally Acquired Subclinical Primary *Pneumocystis* Infection. *Am J Pathol.* 2018;188(2):417-31.

263. Rojas DA, Iturra PA, Méndez A, Ponce CA, Bustamante R, Gallo M, et al. Increase in secreted airway mucins and partial Muc5b STAT6/FoxA2 regulation during *Pneumocystis* primary infection. *Sci Rep.* 14 2019;9(1):2078.
264. Hori S, Carvalho TL, Demengeot J. CD25+CD4+ regulatory T cells suppress CD4+ T cell-mediated pulmonary hyperinflammation driven by *Pneumocystis carinii* in immunodeficient mice. *Eur J Immunol.* 2002;32(5):1282-91.
265. Ruan S, Tate C, Lee JJ, Ritter T, Kolls JK, Shellito JE. Local Delivery of the Viral Interleukin-10 Gene Suppresses Tissue Inflammation in Murine *Pneumocystis carinii* Infection. *Infect Immun.* nov 2002;70(11):6107-13.
266. Meissner NN, Lund FE, Han S, Harmsen A. CD8 T cell-mediated lung damage in response to the extracellular pathogen *Pneumocystis* is dependent on MHC class I expression by radiation-resistant lung cells. *J Immunol.* 15 déc 2005;175(12):8271-9.
267. Ruan S, Samuelson DR, Assouline B, Morre M, Shellito JE. Treatment with Interleukin-7 Restores Host Defense against *Pneumocystis* in CD4+ T-Lymphocyte-Depleted Mice. *Infect Immun.* 2016;84(1):108-19.
268. Li Y, Ghannoum M, Deng C, Gao Y, Zhu H, Yu X, et al. *Pneumocystis* pneumonia in patients with inflammatory or autoimmune diseases: Usefulness of lymphocyte subtyping. *Int J Infect Dis.* avr 2017;57:108-15.
269. Gigliotti F, Crow EL, Bhagwat SP, Wright TW. Sensitized CD8+ T cells fail to control organism burden but accelerate the onset of lung injury during *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Infect Immun.* nov 2006;74(11):6310-6.
270. Roths JB, Sidman CL. Single and combined humoral and cell-mediated immunotherapy of *Pneumocystis carinii* pneumonia in immunodeficient scid mice. *Infect Immun.* mai 1993;61(5):1641-9.
271. Rapaka RR, Goetzman ES, Zheng M, Vockley J, McKinley L, Kolls JK, et al. Enhanced defense against *Pneumocystis carinii* mediated by a novel dectin-1 receptor Fc fusion protein. *J Immunol.* 15 mars 2007;178(6):3702-12.
272. Nelson MP, Christmann BS, Werner JL, Metz AE, Trevor JL, Lowell CA, et al. IL-33 and M2a Alveolar Macrophages Promote Lung Defense against the Atypical Fungal Pathogen *Pneumocystis murina*. *J Immunol.* 15 févr 2011;186(4):2372-81.
273. Bhagwat SP, Gigliotti F, Wang J, Wang Z, Notter RH, Murphy PS, et al. Intrinsic Programming of Alveolar Macrophages for Protective Antifungal Innate Immunity Against *Pneumocystis* Infection. *Front Immunol.* 2018;9:2131.
274. Paine R, Preston AM, Wilcoxon S, Jin H, Siu BB, Morris SB, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in the innate immune response to *Pneumocystis carinii* pneumonia in mice. *J Immunol.* 1 mars 2000;164(5):2602-9.
275. Wright TW, Pryhuber GS, Chess PR, Wang Z, Notter RH, Gigliotti F. TNF receptor signaling contributes to chemokine secretion, inflammation, and respiratory deficits during *Pneumocystis* pneumonia. *J Immunol.* 15 févr 2004;172(4):2511-21.

276. Smith RL, el-Sadr WM, Lewis ML. Correlation of bronchoalveolar lavage cell populations with clinical severity of *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Chest*. janv 1988;93(1):60-4.
277. Mason GR, Hashimoto CH, Dickman PS, Foutty LF, Cobb CJ. Prognostic implications of bronchoalveolar lavage neutrophilia in patients with *Pneumocystis carinii* pneumonia and AIDS. *Am Rev Respir Dis*. juin 1989;139(6):1336-42.
278. Lee JY, Park HJ, Kim YK, Yu S, Chong YP, Kim S-H, et al. Cellular profiles of bronchoalveolar lavage fluid and their prognostic significance for non-HIV-infected patients with *Pneumocystis jirovecii* pneumonia. *J Clin Microbiol*. avr 2015;53(4):1310-6.
279. Benfield TL, Kharazmi A, Larsen CG, Lundgren JD. Neutrophil chemotactic activity in bronchoalveolar lavage fluid of patients with AIDS-associated *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Scand J Infect Dis*. 1997;29(4):367-71.
280. Castro M, Morgenthaler TI, Hoffman OA, Standing JE, Rohrbach MS, Limper AH. *Pneumocystis carinii* induces the release of arachidonic acid and its metabolites from alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. juill 1993;9(1):73-81.
281. Kernbaum S, Masliah J, Alcindor LG, Bouton C, Christol D. Phospholipase activities of bronchoalveolar lavage fluid in rat *Pneumocystis carinii* pneumonia. *Br J Exp Pathol*. févr 1983;64(1):75-80.
282. Kaneshiro ES, Guo Z, Sul D, Kallam KA, Jayasimhulu K, Beach DH. Characterizations of *Pneumocystis carinii* and rat lung lipids: glyceryl ethers and fatty alcohols. *J Lipid Res*. oct 1998;39(10):1907-17.
283. Benfield TL, van Steenwijk R, Nielsen TL, Dichter JR, Lipschik GY, Jensen BN, et al. Interleukin-8 and eicosanoid production in the lung during moderate to severe *Pneumocystis carinii* pneumonia in AIDS: a role of interleukin-8 in the pathogenesis of *P. carinii* pneumonia. *Respir Med*. avr 1995;89(4):285-90.
284. Chiurchiù V, Leuti A, Dalli J, Jacobsson A, Battistini L, Maccarrone M, et al. Pro-resolving lipid mediators Resolvin D1, Resolvin D2 and Maresin 1 are critical in modulating T cell responses. *Sci Transl Med*. 24 août 2016;8(353):353ra111.
285. Martin-Garrido I, Carmona EM, Specks U, Limper AH. *Pneumocystis* pneumonia in patients treated with rituximab. *Chest*. juill 2013;144(1):258-65.
286. Eddens T, Elsegeiny W, de la Luz Garcia-Hernandez M, Castillo P, Trevejo-Nunez G, Serody K, et al. *Pneumocystis* driven inducible bronchus associated lymphoid tissue formation requires Th2 and Th17 immunity. *Cell Rep*. 28 mars 2017;18(13):3078-90.
287. Zhang N-N, Huang X, Feng H-Y, Huang L-N, Xia J-G, Wang Y, et al. Circulating and Pulmonary T-cell Populations Driving the Immune Response in Non-HIV Immunocompromised Patients with *Pneumocystis jirovecii* Pneumonia. *Int J Med Sci*. 2019;16(9):1221-30.
288. Kolls JK, Habetz S, Shean MK, Vazquez C, Brown JA, Lei D, et al. IFN-gamma and CD8+ T cells restore host defenses against *Pneumocystis carinii* in mice depleted of CD4+ T cells. *J Immunol*. 1 mars 1999;162(5):2890-4.

289. Anes E, Kühnel MP, Bos E, Moniz-Pereira J, Habermann A, Griffiths G. Selected lipids activate phagosome actin assembly and maturation resulting in killing of pathogenic mycobacteria. *Nat Cell Biol.* sept 2003;5(9):793-802.
290. Bonilla DL, Fan Y-Y, Chapkin RS, McMurray DN. Transgenic mice enriched in omega-3 fatty acids are more susceptible to pulmonary *tuberculosis*: impaired resistance to *tuberculosis* in fat-1 mice. *J Infect Dis.* 1 févr 2010;201(3):399-408.
291. Johnston RJ, Poholek AC, DiToro D, Yusuf I, Eto D, Barnett B, et al. Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science.* 21 août 2009;325(5943):1006-10.
292. LaPensee CR, Lin G, Dent AL, Schwartz J. Deficiency of the transcriptional repressor B cell lymphoma 6 (Bcl6) is accompanied by dysregulated lipid metabolism. *PLoS ONE.* 2014;9(6):e97090.
293. Gentile PS, Pelus LM. In vivo modulation of myelopoiesis by prostaglandin E2. II. Inhibition of granulocyte-monocyte progenitor cell (CFU-GM) cell-cycle rate. *Exp Hematol.* févr 1987;15(2):119-26.
294. Chiang N, de la Rosa X, Libreros S, Serhan CN. Novel Resolvin D2 Receptor Axis in Infectious Inflammation. *J Immunol.* 15 2017;198(2):842-51.

Valorisation scientifique du travail de thèse et perspectives de valorisation

Communication affichée au congrès national de la Société Française de Mycologie Médicale (SFMM) 2019 à Tours, France.

Charpentier E, Marques C, Menard S, Blanchard N, Chauvin P, Guemas E, Cassaing S, Fillaux J, Valentin A, Berry A, Iriart X. **Comparison of circulating lymphocyte populations CD4+ and CD8+ T cells, B and NK lymphocytes according to the favorable or worsening evolution of patients with pneumocystosis.**

Communication orale au congrès international TIMM (Trends in Medical Mycology) en Octobre 2019 à Nice, France :

Charpentier E, Marques C, Menard S, Blanchard N, Chauvin P, Guemas E, Cassaing S, Fillaux J, Valentin A, Berry A, Iriart X. **Comparison of circulating lymphocyte populations CD4+ and CD8+ T cells, B and NK lymphocytes according to the favorable or worsening evolution of patients with pneumocystosis,**

Les trois articles présentés dans ce manuscrit seront complétés et soumis, avec une possible modification de la structure des articles (association du modèle murin et de l'étude clinique concernant les médiateurs lipidiques de l'inflammation).

Abstract

Pneumocystis pneumonia (PCP) is an opportunistic interstitial pneumonia caused by the fungus *Pneumocystis jirovecii*. In this disease, lung lesions are more related to an excessive inflammatory response of the host than to a direct cytopathogenic action of the fungus. Lymphocytes including CD4 T cells are key cells in the immune response against *P. jirovecii*. Nevertheless, knowledge remains limited on the specific role of lymphocyte subpopulations during PCP. In addition, pro-inflammatory and pro-resolving lipid mediators (SPMs) have been very little studied in PCP. The objective of this thesis work was to study lymphocyte responses, pro-inflammatory and pro-resolving lipid mediators during PCP through two clinical studies and an experimental mouse model study. The first clinical study, conducted in immunocompromised patients with and without PCP, showed that the levels of peripheral blood B cells (LB) were more frequently lowered in infected subjects. On the other hand, in patients diagnosed with PCP, the Th1/Th2 ratio was significantly reduced (Th1 decreased and Th2 increased) in deceased patients. This was associated with a decrease in cytotoxic CD8 T cells and in NK cells in the deceased patients. The second study, on a mouse model, demonstrated a different immune response to *P. murina* depending on the immune status of the host. Notably, the formation of an iBALT (induced Bronchus-associated lymphoid tissue) that included macrophages, LB and probably CD4+ follicular helper (Tfh) cells was observed in immunocompetent mice but was absent in immunocompromised mice. In immunosuppressed mice, the different CD4 T helper profiles were all increased at the peak of infection. Lipid assay showed the involvement of prostaglandin E2 (PGE2) in the pathophysiology of *P. murina* infection, particularly in immunosuppressed mice that had a higher PGE2 concentration at the peak of infection. This was accompanied by an overall increase in SPMs, which were poorly modified in immunocompetent mice. An enrichment of the lipid diet with omega 6 fatty acids improved the disease progression, in association with a decrease in PGE2, an overall decrease in SPMs and an increase in the Th1/Th2 ratio. PGE2 is known to inhibit the Th1 response and induce the production of SPMs, which themselves inhibit the Th1 response. PGE2 may thus represent an important element in the pathophysiology of PCP. The study of lipids in humans has confirmed the interest of PGE2 in the disease because this eicosanoid was higher in patients with an unfavorable progression, in connection with a decreased Th1 response and some higher SPMs concentrations. Patients with an unfavorable evolution also had decreased total omega-6 fatty acids and increased omega-9 fatty acids compared to patients with a favorable evolution. In conclusion, all the data obtained from the clinical studies and the mouse model support the coexistence of two responses to *Pneumocystis* infection, depending on the immune status of the host. LB and Tfh cells appear to be the two major types of lymphocytes in the lungs of infected immunocompetent hosts, organized within iBALT formations. Conversely, in immunocompromised hosts, in the absence of CD4 T and/or LB, a Th1/Tc1 response may be beneficial for the elimination of the fungus. PGE2, which directs host immunity towards a Th2 response and resolution of inflammation, could thus hinder the elimination of *Pneumocystis* in an immunocompromised context. Further studies will be necessary to understand these mechanisms and the effect of lipid dietary intake, particularly of omega 6 fatty acids. The interest of PGE2, Th1 CD4 T cells and cytotoxic CD8 T cells as prognostic markers of PCP will need to be confirmed on a wider scale.

Keywords : Pneumocystis, Inflammation, Fungus, Pro-resolving, Lipids, lymphocytes

Eléna Charpentier

Médiateurs lipidiques de l'inflammation et populations lymphocytaires au cours des infections à *Pneumocystis* : Etudes cliniques et modèle murin

Thèse dirigée par le Dr Xavier Iriart et soutenue le 30 septembre 2020, à Toulouse

La pneumocystose (PCP) est une pneumonie interstitielle opportuniste due au champignon *Pneumocystis jirovecii*. Au cours de cette maladie, les lésions pulmonaires sont davantage liées à une réponse inflammatoire excessive de l'hôte, qu'à une action cytopathogène directe du champignon. Les lymphocytes dont les T CD4 sont des cellules clés de la réponse immune contre *P. jirovecii*. Néanmoins, les connaissances restent limitées sur le rôle spécifique des sous-populations lymphocytaires au cours de la PCP. Par ailleurs, les lipides pro-inflammatoires et pro-résolutifs de l'inflammation (SPM) ont été très peu étudiés dans le cadre de la PCP. Ce travail de thèse avait pour objectif d'étudier les réponses lymphocytaires et les réponses lipidiques pro-inflammatoires et pro-résolutives au cours de la PCP grâce à deux études cliniques et une étude expérimentale sur modèle murin. La première étude clinique, réalisée chez des patients immunodéprimés atteints ou non de PCP, a montré un taux de lymphocytes B (LB) sanguins plus fréquemment abaissé chez les sujets infectés. Chez les patients atteints de PCP, le ratio Th1/Th2 était significativement abaissé (Th1 sanguins diminués et Th2 augmentés) chez les patients décédés. Ceci était associé à une diminution des T CD8 cytotoxiques et des cellules NK chez les patients décédés. La 2^{ème} étude sur modèle murin a mis en évidence une réponse immune différente à *P. murina* en fonction du statut immunitaire de l'hôte, en particulier la formation de structures iBALT (Induced Bronchus-Associated Lymphoid Tissue) regroupant des macrophages, des LB et lymphocytes T probablement CD4 Tfh chez les souris immunocompétentes mais absentes chez les souris immunodéprimées. En cas d'immunodépression, les différents profils de T CD4 helper étaient tous augmentés au pic de l'infection. Le dosage des lipides a montré l'implication de la prostaglandine E2 (PGE2) dans la physiopathologie de l'infection à *P. murina*, notamment pour les souris immunodéprimées qui avaient une concentration plus élevée en PGE2 au pic de l'infection. Ceci était accompagné d'une augmentation globale des SPMs, qui étaient au contraire peu modifiés chez les souris immunocompétentes. Un enrichissement du régime lipidique en oméga 6 améliorait l'évolution de la maladie, en association avec une diminution de la PGE2, une diminution globale des SPMs et une augmentation du ratio Th1/Th2. La PGE2 est connue pour inhiber la réponse Th1 et induire la production de SPMs, eux même inhibiteurs de la réponse Th1. Elle pourrait ainsi représenter un élément important dans la physiopathologie de la PCP. L'étude des lipides chez l'Homme a confirmé l'intérêt de la PGE2 dans la maladie car cet eicosanoïde était plus élevé chez les patients évoluant défavorablement, en lien avec une réponse Th1 diminuée et certains SPM plus élevés. Les patients évoluant défavorablement avaient aussi des acides gras oméga 6 totaux diminués et des acides gras oméga 9 augmentés par rapport aux patients évoluant favorablement. En conclusion, l'ensemble des données obtenues à partir des études cliniques et du modèle murin est en faveur de la coexistence de deux réponses à une infection par *Pneumocystis*, selon le statut immunitaire de l'hôte. Les réponses Tfh et LB semblent être majoritaires chez un hôte immunocompétent au sein de formations iBALT. A l'inverse, chez les hôtes immunodéprimés, en l'absence de T CD4 et/ou de LB, une réponse Th1/Tc1 pourrait être bénéfique pour l'élimination du champignon. La PGE2 qui oriente l'immunité de l'hôte vers une réponse Th2 et la résolution de l'inflammation pourrait s'opposer à la bonne élimination de *Pneumocystis* dans un contexte d'immunodépression. Des études complémentaires seront nécessaires afin de comprendre ces mécanismes et l'effet de l'apport nutritionnel en lipides, notamment en oméga 6. L'intérêt de la PGE2, des T CD4 Th1 et des T CD8 cytotoxiques en tant que marqueurs pronostiques de la PCP devra être confirmé à plus large échelle.

Mots clés : *Pneumocystis*, Inflammation, Champignon, Pro-résolutif, Lipides, Lymphocytes

Spécialité : Microbiologie

Unité de recherche : Equipe EIPIC – CPTP UMR 1043 Inserm/CNRS