



UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER
FACULTE DE SANTE
DEPARTEMENT DES SCIENCES
PHARMACEUTIQUES

ANNEE : 2022

THESE : 2022/TOU3/2078

THESE

POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement par

COTTREL CLAIRE

**REPONSE LYMPHOCYTAIRE CONTRE *PNEUMOCYSTIS* :
IMPACT D'UN CONTACT PREALABLE AVEC
PNEUMOCYSTIS MURINA SUR LES REPONSES IMMUNES
ET LEUR CINETIQUE
DANS UN MODELE MURIN IMMUNOCOMPETENT**

Le 17 Octobre 2022

Directeur de thèse : Docteur IRIART, Xavier

JURY

Président : Monsieur le Professeur VALENTIN, Alexis
1er assesseur : Monsieur le Professeur BERRY, Antoine
2ème assesseur : Madame le Docteur BOST, Chloé
3ème assesseur : Madame le Docteur MENARD, Sandie

**PERSONNEL ENSEIGNANT
de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier
au 1er octobre 2020**

Professeurs Emérites

Mme BARRE A.	Biologie Cellulaire
M. BENOIST H.	Immunologie
M. BERNADOU J.	Chimie Thérapeutique
M. CAMPISTRON G.	Physiologie
M. GAIRIN J.E.	Pharmacologie
Mme NEPVEU F.	Chimie analytique
M. ROUGE P.	Biologie Cellulaire
M. SALLES B.	Toxicologie

Professeurs des Universités

Hospitalo-Universitaires

Mme AYYOUB M.	Immunologie
M. CESTAC P.	Pharmacie Clinique
M. CHATELUT E.	Pharmacologie
Mme DE MAS MANSAT V.	Hématologie
M. FAVRE G.	Biochimie
Mme GANDIA P.	Pharmacologie
M. PARINI A.	Physiologie
M. PASQUIER C. (Doyen)	Bactériologie - Virologie
Mme ROQUES C.	Bactériologie - Virologie
Mme ROUSSIN A.	Pharmacologie
Mme SALLERIN B.	Pharmacie Clinique
M. VALENTIN A.	Parasitologie

Universitaires

Mme BERNARDES-GÉNISSON V.	Chimie thérapeutique
Mme BOUTET E.	Toxicologie - Sémiologie
Mme COUDERC B.	Biochimie
M. CUSSAC D. (Vice-Doyen)	Physiologie
M. FABRE N.	Pharmacognosie
Mme GIROD-FULLANA S.	Pharmacie Galénique
M. GUIARD B.	Pharmacologie
M. LETISSE F.	Chimie pharmaceutique
Mme MULLER-STAUTMONT C.	Toxicologie - Sémiologie
Mme REYBIER-VUATTOUX K.	Chimie analytique
M. SEGUI B.	Biologie Cellulaire
Mme SIXOU S.	Biochimie
M. SOUCHARD J-P.	Chimie analytique
Mme TABOULET F.	Droit Pharmaceutique
M. VERHAEGHE P.	Chimie Thérapeutique

Maîtres de Conférences des Universités

Hospitalo-Universitaires		Universitaires	
M. DELCOURT N.	Biochimie	Mme ARELLANO C. (*)	Chimie Thérapeutique
Mme JUILLARD-CONDAT B.	Droit Pharmaceutique	Mme AUTHIER H.	Parasitologie
M. PUISSET F.	Pharmacie Clinique	M. BERGE M. (*)	Bactériologie - Virologie
Mme ROUCH L.	Pharmacie Clinique	Mme BON C. (*)	Biophysique
Mme ROUZAUD-LABORDE C.	Pharmacie Clinique	M. BOUAJILA J. (*)	Chimie analytique
Mme SERONIE-VIVIEN S (*)	Biochimie	M. BROUILLET F.	Pharmacie Galénique
Mme THOMAS F. (*)	Pharmacologie	Mme CABOU C.	Physiologie
		Mme CAZALBOU S. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme CHAPUY-REGAUD S.	Bactériologie - Virologie
		Mme COLACIOS C.	Immunologie
		Mme COSTE A. (*)	Parasitologie
		Mme DERA EVE C. (*)	Chimie Thérapeutique
		Mme ECHINARD-DOUIN V.	Physiologie
		Mme EL GARAH F.	Chimie Pharmaceutique
		Mme EL HAGE S.	Chimie Pharmaceutique
		Mme FALLONE F.	Toxicologie
		Mme FERNANDEZ-VIDAL A.	Toxicologie
		Mme GADEA A.	Pharmacognosie
		Mme HALOVA-LAJOIE B.	Chimie Pharmaceutique
		Mme JOUANJUS E.	Pharmacologie
		Mme LAJOIE-MAZENC I.	Biochimie
		Mme LEFEVRE L.	Physiologie
		Mme LE LAMER A-C.	Pharmacognosie
		M. LE NAOUR A.	Toxicologie
		M. LEMARIE A.	Biochimie
		M. MARTI G.	Pharmacognosie
		Mme MONFERRAN S.	Biochimie
		M. SAINTE-MARIE Y.	Physiologie
		M. STIGLIANI J-L.	Chimie Pharmaceutique
		M. SUDOR J. (*)	Chimie Analytique
		Mme TERRISSE A-D.	Hématologie
		Mme TOURRETTE-DIALLO A. (*)	Pharmacie Galénique
		Mme VANSTEELANDT M.	Pharmacognosie
		Mme WHITE-KONING M. (*)	Mathématiques

(*) Titulaire de l'habilitation à diriger des recherches (HDR)

Enseignants non titulaires

Assistants Hospitalo-Universitaires		Attaché Temporaire d'Enseignement et de Recherche (ATER)	
Mme LARGEAUD L.	Immunologie	M. François-Xavier TOUBLET	Chimie Thérapeutique
M. LE LOUEDEC F.	Pharmacologie		
M. MOUMENI A.	Biochimie		
M. PAGES A.	Pharmacie Clinique		
Mme SALABERT A.S	Biophysique		
Mme TRIBAUDEAU L.	Droit Pharmaceutique		

SERMENT DE GALIEN

En présence des Maitres de la Faculté, je fais le serment :

- D'honorer ceux qui m'ont instruit(e) dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle aux principes qui m'ont été enseignés et d'actualiser mes connaissances
- D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de Déontologie, de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers la personne humaine et sa dignité
- En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.
- De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma profession
- De faire preuve de loyauté et de solidarité envers mes collègues pharmaciens
- De coopérer avec les autres professionnels de santé

Que les Hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert(e) d'opprobre et méprisé(e) de mes confrères si j'y manque.

Date

Signature de l'étudiant et du Président du jury

Sommaire

Personnel enseignant de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques de l'Université Paul Sabatier.....	2
Serment de Galien.....	4
Remerciements.....	8
Liste des abréviations.....	11
Index des figures et annexes.....	12
I. Introduction.....	13
II. Revue de la littérature.....	14
<i>II. A. Rappels d'immunologie générale.....</i>	<i>14</i>
II. A. a. Objectifs de la réponse immune.....	14
II. A. b. Dichotomie immunité innée et acquise.....	14
II. A. c. Les lymphocytes.....	16
II. A. c. 1. Structure du système lymphoïde.....	16
II. A. c. 2. Lymphocytes T.....	17
II. A. c. 2. i. Ontogénie des lymphocytes T.....	17
II. A. c. 2. ii. Activation des LT naïfs.....	17
II. A. c. 2. iii. Les sous-populations lymphocytaires T CD4+.....	17
II. A. c. 2. iv. Les sous-populations lymphocytaires T CD8+.....	19
II. A. c. 3. Lymphocytes B.....	19
II. A. c. 3. i. Ontogénie des lymphocytes B.....	20
II. A. c. 3. ii. Activation des LB.....	20
II. A. c. 3. iii. Structure et rôle des centres germinatifs.....	21
II. A. c. 4. La réponse mémoire lymphocytaire.....	22
<i>II. B. Immunologie du poumon.....</i>	<i>23</i>
II. B. a. Le tractus respiratoire.....	23
II. B. b. Un organe barrière.....	23
II. B. b. 1. Clairance muco-ciliaire.....	24
II. B. b. 2. Alvéoles.....	24
II. B. b. 3. Sécrétion de peptides antimicrobiens.....	25
II. B. c. Initiation des réponses innées.....	25
II. B. d. La réponse immunitaire adaptative.....	26
II. B. d. 1. BALT.....	26
II. B. d. 2. iBALT.....	27
II. B. d. 3. Lymphocytes mémoires résidents.....	28
II. B. e. Le Microbiote respiratoire.....	29
<i>II. C. Place de Pneumocystis en santé humaine.....</i>	<i>31</i>
II. C. a. Biologie du champignon.....	31

II. C. a. 1. Taxonomie.....	31
II. C. a. 2. Formes du champignon	31
II. C. a. 3. Cycle	31
II. C. b. Acquisition de <i>Pneumocystis</i>	32
II. C. c. Portage de <i>Pneumocystis</i>	33
II. C. d. Pathologie : la pneumocystose.....	34
II. C. d. 1. Historique	34
II. C. d. 2. Épidémiologie	35
II. C. d. 3. Populations à risque	35
II. C. d. 4. Clinique	36
II. C. d. 5. Physiopathologie	38
II. C. d. 6. Diagnostic biologique	39
II. C. d. 6. i. Prélèvements	39
II. C. d. 6. ii. Microscopie.....	39
II. C. d. 6. iii. Diagnostic moléculaire	40
II. C. d. 6. iv. Dosage des β -D-Glucanes	41
II. C. d. 7. Traitement et prophylaxie	41
<i>II. D. Réponse immune contre <i>Pneumocystis</i></i>	43
II. D. a. Modèles d'études de <i>Pneumocystis</i>	43
II. D. a. 1. Études chez l'Homme	43
II. D. a. 2. Études sur modèles animaux	43
II. D. a. 3. Mode d'infection des animaux.....	44
II. D. a. 4. Difficultés d'interprétation des modèles murins	45
II. D. b. La réponse immune chez un hôte immunocompétent.....	46
II. D. b. 1. Reconnaissance	46
II. D. b. 2. Afflux des cellules aux poumons	46
II. D. b. 3. Réponse T.....	48
II. D. b. 4. Réponse B	48
II. D. b. 5. Coopération B et T.....	49
II. D. b. 6. Élimination de <i>Pneumocystis</i>	49
II. D. c. Influence d'une primo-infection ou d'une réinfection sur la réponse immunitaire dirigée contre <i>Pneumocystis</i> sur les modèles murins de pneumocystose.....	50
III. Objectifs de l'étude	51
IV. Matériels et Méthodes.....	52
IV. A. Souris utilisées.....	52
IV. B. Infection des souris.....	52
IV. C. Protocole expérimental	52
IV. D. Évaluation de la charge fongique.....	54
IV. E. Histopathologie des poumons.....	54

IV. F.	<i>Étude des réponses lymphocytaires par cytométrie en flux.....</i>	55
IV. G.	<i>Analyse statistique</i>	55
V.	Résultats	57
V. A.	<i>Les souris pré-exposées à Pneumocystis ont une charge fongique indétectable par rapport aux souris primo-infectées.....</i>	57
V. B.	<i>Les souris pré-exposées à Pneumocystis présentent des cinétiques de réponses lymphocytaires plus précoces par rapport aux souris primo-infectées</i>	58
V. C.	<i>Les souris pré-exposées à Pneumocystis ont acquis une mémoire immunitaire suite à leur premier contact.....</i>	59
V. D.	<i>Les souris pré-exposées à Pneumocystis produisent des structures iBALT-like avec une cinétique différente des souris primo infectées.....</i>	61
VI.	Discussion.....	64
VII.	Conclusion.....	68
	Bibliographie.....	69

Remerciements

Au Professeur **Alexis Valentin**, merci de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Je vous remercie pour le temps consacré à la lecture de ce travail. Trouvez ici le témoignage de ma reconnaissance et de ma profonde estime.

Au Professeur **Antoine Berry**, merci de me faire l'honneur de juger ce travail. Merci pour vos nombreux enseignements et votre soutien dans toutes mes démarches professionnelles. Vous avez toujours répondu à mes questionnements malgré vos obligations et je vous en remercie.

Au Docteur **Chloé Bost**, merci de me faire l'honneur de juger ce travail et d'apporter ton expertise au point de vue immunologie.

Au Docteur **Sandie Ménard**, sans tes compétences techniques et ta rigueur scientifique ce projet n'aurait pas pu exister. Un grand merci pour ta patience, ta bienveillance et la formation dont tu m'as fait bénéficier toute l'année.

Au Docteur **Xavier Iriart**, merci de m'avoir pris sous ton aile il y a maintenant trois ans. Je te remercie de m'avoir proposé ce projet et de m'avoir accompagnée dans toutes les démarches ayant permis la réalisation de cette année recherche. Merci pour ta confiance, ton optimisme et ton énergie, merci pour toutes les corrections qui ont permis de valoriser au mieux ce travail.

Merci au Docteur **Elena Charpentier** dont les travaux de thèse ont été les fondements de ce projet. Je te souhaite un bel avenir dans la parasitologie – mycologie, en particulier dans l'étude de *Pneumocystis*.

Merci au Docteur **Nicolas Blanchard** de m'avoir accueillie au sein de votre équipe Inserm et de nous avoir conseillé sur les interprétations de nos résultats.

Merci à l'équipe **EPIIC** : Aboubacar, Alexis, Amel, Antoine, Catherine, Chloé, Émilie et Émilie, Fred, Lucie, Marcy, Marine, Nicolas, Rémi, Renzo, Romain, Sandie et Xavier pour l'accueil et la bonne humeur.

Merci aux **Biologistes de parasito-myc** du CHU de Toulouse, Alexis, Antoine, Émilie, Judith, Pamela, Sophie et Xavier. Vous m'avez accueillie toute l'année dans l'équipe des biologistes et j'ai hâte que nous ayons des relations de confrères à l'issue de mon internat.

Aux **Techniciens de parasito-myc** du CHU de Toulouse, en morpho : Carole, Cathy, Céline, Clément, Clémence, Coralie, Hubert, Isabelle, MP et Sophie ; en séro-biomol : Catherine, Delphine, Linda, et Yohan ; Alan, Elodie, Julie et Valérie, merci de m'avoir transmis votre savoir-faire et votre passion pour ce métier aux cours de mes différents stages.

Je tiens à remercier l'**équipe enseignante de la faculté de Pharmacie de Nantes**, en particulier le Professeur Nathalie Caroff et Mme Isabelle Ourliac qui m'ont beaucoup soutenue dans la préparation du concours d'internat et au fil des années de pharma, ainsi que les Professeurs Patrice Le Pape et Florent Morio pour m'avoir transmis la passion pour la parasitologie – mycologie médicale et m'avoir permis d'y mettre un premier pied lors de mes stages de M1 et d'externe.

A **mes parents et ma sœur** qui m'ont soutenu depuis le début et ont toujours fait en sorte que je ne manque de rien et que je sois dans les meilleures dispositions pour réussir.

A **Mamie, Papy et Philippe** qui ont été ma bouffée d'air frais hebdomadaire pendant de nombreuses années et sur qui je pourrai toujours compter.

A **Marielle**, qui m'a suivie jusqu'au bac puis qui m'a soutenue lors de mes années fac, merci de ta présence qui survit au temps, je te souhaite plein de bonheur dans la vie qui t'attend.

Aux **Bananes**, Nadège ma binôme, Blandine, Cindy et Manon les colloques de toujours, Nolu, Momo, CC mon binôme de badminton, Youssef et ton éternelle bonne humeur, Lambert notre futur papa, Paul et les plus récents ayant intégrés le groupe Naïma et Laura, merci pour toutes ces soirées, ces parties de tarot et ces bons moments passés malgré nos études difficiles.

Aux **nantais à Toulouse** : Charline, depuis notre rencontre à Nantes, nous nous sommes suivies à Toulouse sans savoir vraiment à quoi s'attendre... entre galères d'interne et aléas de la vie, nous nous sommes toujours serrées les coudes et j'espère que cela continuera ainsi. Arthur, je compte sur toi pour continuer à mettre l'épreuve mon premier degré, Flavien merci de me supporter chaque jour avec mes TOC et mes séries.

Aux **internes** de la promo de pharmacie toulousaine : Caroline, Delphine, Dorian, Julia, Orancie, Pierre-Luc, et les petites amibes : Alban, Marine et Tom. Puissiez-vous avoir un bel avenir dans la biologie médicale.

Aux **Morues** : Caroline la peuchère, Julia la compulsive, Laurie la banane, Isabelle la portugaise et Claudia la nighteuse, merci d'avoir égayé ce premier semestre avec vos rires, vos enseignements pour les mamans et votre gentillesse.

A **Pauline**, avec qui j'ai passé cette année de M2 et qui m'a fait découvrir la vie parisienne.

A **Paul**, merci de me supporter, m'aimer et de me soutenir chaque jour. J'ai hâte de découvrir le futur avec toi à mes côtés.

Liste des Abréviations

Ac : anticorps

APAFIS : Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques

BALT : Tissu Lymphoïde Associé aux Bronches (en anglais : Bronchus-Associated Lymphoid Tissue)

BCR : B-Cell Receptor

BPCO : Broncho-Pneumopathie Chronique Obstructive (Acronyme anglais COPD)

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité (Acronyme anglais : HLA/MHC)

CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène (Acronyme anglais : APC)

CREFRE : Centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et de Ressources Expérimentales

Ct : Cycle threshold

CTC : corticostéroïdes

DC : Cellule Dendritique (en anglais : Dendritic Cell)

FRET : Fluorescence-Resonance Energy Transfer

G6PD : Glucose-6-Phosphate Déshydrogénase

HAS : Haute Autorité de Santé

HE : Hématoxyline-Eosine

HEV : veinules à haut endothélium (en anglais : High Endothelial Venules)

iBALT : Tissu Lymphoïde Induit Associé aux Bronches (en anglais : induced Bronchus-Associated Lymphoid Tissue)

IFI : Infection Fongique Invasive

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

ILC : Innate Lymphoid Cell

LBA : Lavage Broncho-Alvéolaire

LPS : LipoPolySaccharide

MSG : Major Surface Glycoprotein

NK : Natural Killer

OL-I / OL-II / OL-III : Organe lymphoïde primaire / secondaire / tertiaire

PCP : Pneumocystose ou pneumonie à *Pneumocystis*

PCR : Réaction de Polymérisation en chaîne (en anglais : Polymerase Chain Reaction)

PFA : paraformaldéhyde

PMA : phorbol myristic acetate

PNA : PeaNut Agglutinin

PNAd : Adressine des ganglions lymphatiques périphériques (en anglais : Peripheral lymph Node Addressin)

PNE : PolyNucléaire Eosinophile (en anglais PME : PolyMorphonuclear Eosinophil)

PNN : PolyNucléaire Neutrophile (en anglais PMN : PolyMorphonuclear Neutrophil)

RAMD : dépôt de cellules mémoires associé aux lésions (en anglais : Repair Associated Memory Depots)

RESSIF : RESeau de Surveillance des Infections Fongiques

RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium

S1, S3, S6 : point de cinétique à 1 semaine, 3 semaines et 6 semaines

SCID : Severe Combined ImmunoDeficiency

SVF : sérum de veau fœtal

TCR : T-Cell Receptor

T_H : Lymphocyte T auxiliaire (en anglais : T helper)

TLR : Récepteur de type Toll (en anglais : Toll Like Receptor)

Treg : Lymphocyte T régulateur

T_{CM} : Lymphocyte T centro-mémoire

T_{EM} : Lymphocyte T effecteur mémoire

T_{R1} : Lymphocyte régulateur de type 1

T_{RM} : Lymphocyte T résident mémoire

VIH : Virus de l'Immunodéficience acquise Humaine (en anglais : HIV)

Index des Figures et Annexes

Figure 1 – Les acteurs de l’immunité	16
Figure 2 – Activation des LB au sein des centres germinatifs.....	21
Figure 3 – Localisation et fonction des sous-populations lymphocytaires mémoires	22
Figure 4 – Structure des iBALT.....	27
Figure 5 - Cycle théorique de multiplication de <i>Pneumocystis jirovecii</i>	32
Figure 6 – Différences de clinique entre un patient VIH positif et un patient VIH négatif atteints de PCP.....	37
Figure 7 - Exemple d’anomalies radiologiques observées lors de la PCP.....	38
Figure 8 – Diagnostic microscopique de <i>Pneumocystis</i>	40
Figure 9 – Cinétiques de réponse lors de l’infection à <i>P. murina</i> dans des modèles immunocompétents Balb/c.....	47
Figure 10 – Schéma hypothétique des réponses immunes de l’hôte immunocompétent suite à l’infection par <i>Pneumocystis</i>	50
Figure 11- Schéma du protocole expérimental suivi	53
Figure 12 - Cinétique de la charge fongique au cours de la cinétique.....	57
Figure 13 - Cinétique des sous populations effectrices lymphocytaires T CD4 et CD8 pulmonaires en réponse à l’infection par <i>P. murina</i>	58
Figure 14 - Cinétique des cellules mémoires en réponse à l’infection par <i>P. murina</i>	60
Figure 15 - Les follicules sont composés de lymphocytes B et T	61
Figure 16- Cinétique des iBALT en histologie.....	62
Annexe 1 – Panel utilisé ciblant les sous-populations lymphocytaires T avec stimulation par la PMA/ionomycine (A) et stratégie de gating utilisée (B) sur les poumons	79
Annexe 2 – Panel utilisé ciblant les sous-populations lymphocytaires T avec stimulation par la PMA/ionomycine (A) et stratégie de gating utilisée (B) sur les rates	80
Annexe 3 – Communication affichée issue de ce travail.....	81

I. Introduction

Pneumocystis est un champignon ubiquitaire atypique découvert il y a environ un siècle. La pathologie qu'il peut causer chez l'immunodéprimé, la pneumocystose, reste, à l'heure actuelle, d'importance notable aux vues de l'évolution de la médecine moderne, en effet elle représente la deuxième cause d'infection fongique invasive en France. Cependant l'étude de ce champignon est limitée et les connaissances sont difficiles à acquérir. De nombreuses avancées ont été faites depuis la découverte de *Pneumocystis* aussi bien sur les aspects de physiologie du champignon que de physiopathologie de la maladie. Lors de ce travail de thèse d'exercice nous avons souhaité compléter les connaissances concernant l'immunophysiopathologie de l'infection à *Pneumocystis*. Ce manuscrit est composé d'une revue de la littérature balayant des notions d'immunologie et l'état des connaissances sur *Pneumocystis*, puis les objectifs, le matériel et méthodes ainsi que les principaux résultats sont présentés avant d'être discutés dans une dernière partie. Ce travail a été réalisé dans le cadre du Master 2 Recherche « Biologie Moléculaire et Cellulaire, parcours Parasitologie – Mycologie médicale » de Sorbonne Université (année 2021-2022) au sein de l'équipe Inserm n°6 de Nicolas Blanchard à Infinity Toulouse Purpan.

II. Revue de la littérature

Dans cette première partie, nous allons aborder quatre points : i) des aspects d'immunologie générale, ii) des notions sur le poumon et son immunité, puis iii) des généralités sur le champignon au cœur de ce travail : *Pneumocystis* et enfin iv) les connaissances actuelles sur la réponse immune de l'immunocompétent contre *Pneumocystis*.

II. A. Rappels d'immunologie générale

Afin de commencer à appréhender ce travail, nous allons dans un premier temps préciser quelques concepts fondamentaux d'immunologie générale (1).

II. A. a. Objectifs de la réponse immune

Au cours d'une agression par un micro-organisme, un ensemble de réponse est déployé chez un individu afin de retrouver l'état d'homéostasie. Ces réponses, appelées réponses immunes, s'articulent dans un schéma complexe impliquant des mécanismes cellulaires, moléculaires et géniques. Ces réponses ont pour but d'éliminer l'agresseur, de garder en mémoire la rencontre avec ce dernier et de permettre un retour à la situation initiale. Parfois, les effets des réponses immunes peuvent être délétères et responsables d'effets cytopathogènes chez un individu.

Les cellules spécialisées dans les réponses immunes sont appelées leucocytes et sont caractérisées par l'expression du marqueur CD45.

II. A. b. Dichotomie immunité innée et acquise

Classiquement, les réponses immunes sont définies en deux grands types : la réponse innée et la réponse adaptative. Ces réponses sont plus ou moins efficaces selon le type de pathogène impliqué.

La **réponse innée** est la première impliquée dans la lutte contre les pathogènes. Elle n'est pas spécifique du pathogène en question et est effective en quelques heures.

Le pathogène est d'abord reconnu par des récepteurs non spécifiques de type Toll-like récepteur (TLR) présents à la surface des cellules épithéliales ou des cellules immunitaires résidentes. Les cellules ainsi activées vont produire, après modulation génique, des cytokines

inflammatoires à résonance locale ou systémique. La diffusion systémique de ces signaux va permettre le recrutement des leucocytes circulants (polynucléaires neutrophiles -PNN-, monocytes) qui pourront migrer dans le tissu d'appel par diapédèse (phénomène de traversé des endothéliums). Les cellules ainsi recrutées participeront à l'élimination du pathogène grâce à différents effecteurs moléculaires cytolytiques (nétose, libération d'espèces réactives de l'oxygène...).

Au cours de cette phase, le micro-organisme sera capté par des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Les CPA vont ensuite migrer vers les organes lymphoïdes secondaires (OL-II). Les CPA vont digérer les résidus de micro-organismes et apprêter les antigènes résultant afin de les présenter via le complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) aux lymphocytes naïfs. C'est le début de la **réponse adaptative** qui est spécifique d'antigène et déployée en quelques jours. Les lymphocytes activés iront ensuite sur le lieu de l'infection pour participer à l'élimination du pathogène. L'efficacité de la réponse adaptative augmente au fil des contacts avec le pathogène (principe exploité dans les stratégies de vaccination).

Historiquement, les réponses innée et adaptative sont décrites comme agissant séquentiellement : d'abord la réponse innée rapide puis la réponse adaptative. Toutefois le dogme de la scission innée/adaptative semble aujourd'hui obsolète. En effet la découverte du phénomène « d'immunité entraînée » au sein du système inné ou « trained immunity » (2) et la description des cellules lymphoïdes innées (ILC) (3) et autres lymphocytes atypiques (**Figure 1**) rendent cette séparation conceptuelle plus floue à l'heure actuelle. De plus, il est reconnu que les réponses innée et adaptative se déroulent en parallèle dans les étapes d'élimination d'un pathogène bien que la réponse adaptative nécessite plus de temps pour se mettre en place.

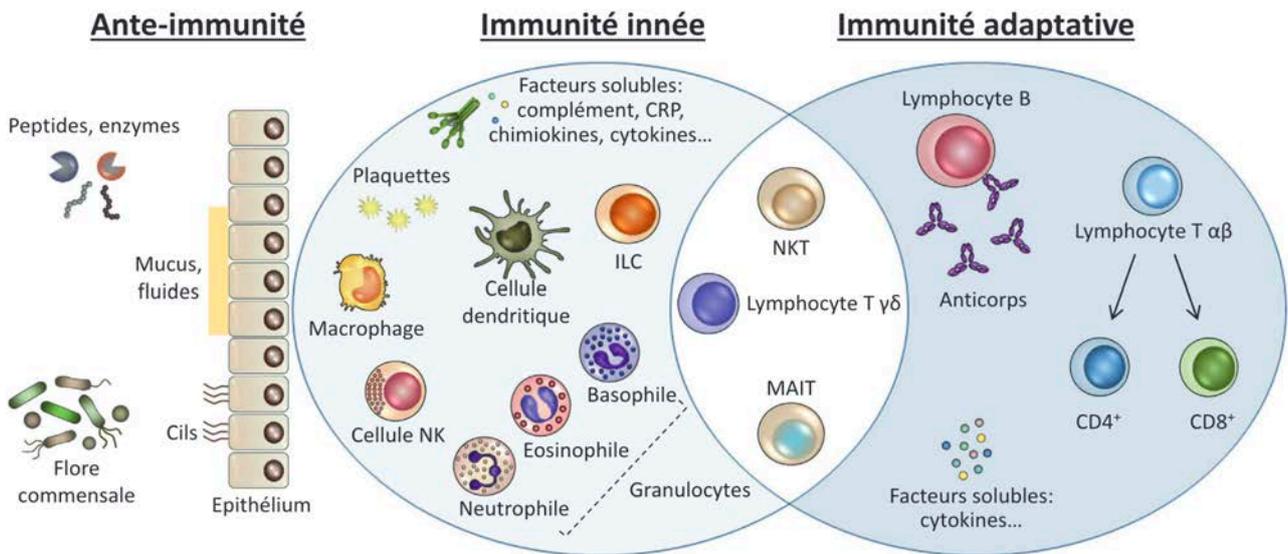


Figure 1 – Les acteurs de l’immunité. Schéma tiré de « Immunologie fondamentale et immunopathologie », 2018 (1).

II. A. c. Les lymphocytes

Les lymphocytes sont des cellules immunitaires dont l’origine hématopoïétique est lymphoïde. Ils sont divisés en deux types cellulaires : les lymphocytes T (LT) responsables de l’immunité à médiation « cellulaire » caractérisés par l’expression du marqueur membranaire CD3 et les lymphocytes B (LB) à médiation « humorale » caractérisés par l’expression du marqueur membranaire B220.

II. A. c. 1. Structure du système lymphoïde

Le système immunitaire est composé d’organes et de tissus dédiés à la production de lymphocytes. Ces structures sont connectées entre elles par les circulations sanguine et lymphatique, permettant une communication fine entre les différents acteurs de l’immunité.

Les lymphocytes naïfs sont générés dans les organes lymphoïdes primaires (OL-I) : moelle osseuse (LB) et thymus (LT) puis migrent vers les OL-II : rate et ganglions, où ils pourront rencontrer des antigènes entraînant leur activation.

II. A. c. 2. Lymphocytes T

II. A. c. 2. i. Ontogénie des lymphocytes T

Les précurseurs T proviennent de la moelle osseuse puis migrent vers le thymus et forment les thymocytes. Au sein du thymus, plusieurs étapes de sélection positives et négatives aboutissent à la persistance de LT naïfs simples positifs pour le CD4 ou le CD8. Ces marqueurs définissent les deux populations lymphocytaires T conventionnelles : LT CD4 et LT CD8. Les LT naïfs expriment à leur membrane un TCR spécifique d'antigènes généré aléatoirement par réarrangement des gènes du TCR au cours de la sélection thymique et restreint par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). L'ensemble des TCR produits constitue le répertoire T.

Différents facteurs sont impliqués dans l'ontogénie des LT, notamment l'IL-7 produit par les cellules épithéliales thymiques qui agit en tant que facteur de prolifération des thymocytes immatures.

Les LT naïfs sont ensuite retrouvés dans le sang et circulent entre les différents OL-II.

II. A. c. 2. ii. Activation des LT naïfs

Lorsqu'un pathogène est présent dans un tissu périphérique, les CPA vont appréhender l'antigène, le présenter sur leur CMH et migrer vers les OL-II drainant pour y rencontrer les lymphocytes naïfs spécifiques.

L'activation des LT naïfs nécessite trois interactions formant la synapse immunologique : i) l'engagement du TCR, ii) la mise en place de signaux de costimulation entre la CPA (CD80/CD86) et le LT naïf (CD28) et iii) la polarisation du LT par signaux cytokiniques. Le signal cytokinique est variable suivant qu'il s'agisse d'un LT CD4 ou d'un LT CD8.

II. A. c. 2. iii. Les sous-populations lymphocytaires T CD4+

La polarisation des LT CD4+ constitue une différenciation fonctionnelle des cellules en plusieurs sous-populations. Cette polarisation est induite par le signal cytokinique issu principalement des CPA activant le LT CD4 naïf (aussi appelé T_H0). La classification des sous-populations lymphocytaires T s'enrichit continuellement mais on peut néanmoins classer les

LT CD4 en trois grandes catégories : i) les cellules effectrices ; ii) les cellules régulatrices ; iii) les cellules mémoires.

Parmi les cellules effectrices, les **lymphocytes T_{H1}** sont induits par l'Il-12 et l'interféron-gamma (IFN- γ). Le facteur de transcription impliqué est T-Bet et ces cellules sécrètent principalement le Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) et l'IFN- γ . Les T_{H1} participent à l'activation des lymphocytes T CD8 cytotoxiques, à la polarisation M1 des macrophages et induisent une activité cytolytique globale permettant la résolution des infections à germes intracellulaires (virus, bactéries intra-cellulaires). Ces cellules conduisent parfois à des effets cytopathogènes et sont impliquées dans les mécanismes d'auto-immunité.

Les **lymphocytes T_{H2}** sont induits par l'Il-4. Le facteur de transcription impliqué est GATA3 et ces cellules sécrètent principalement le l'Il-4, l'Il-5 et l'Il-13. Les T_{H2} permettent l'activation des LB en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Les IgE produites ainsi que les Polynucléaires Éosinophiles (PNE) vont participer à la défense contre les helminthes mais également aux réponses allergiques. Plus globalement, la réponse humorale permet de lutter contre les germes extra-cellulaires comme les bactéries. Il est à noter que le développement des réponses T_{H1} et T_{H2} sont mutuellement antagonistes.

Les **lymphocytes T_{H17}** sont induits par l'Il-6 et le Tumor Growth Factor Beta (TFG- β). Le facteur de transcription impliqué est ROR- γ t et ces cellules sécrètent principalement l'Il-17, l'Il-21 et l'Il-22. La réponse T_{H17} permet le recrutement des phagocytes, importants dans l'élimination des bactéries et des champignons (PNN).

Les **lymphocytes T folliculaires auxiliaires** (en anglais « follicular helper », T_{FH}) sont induits par l'Il-6 et l'Il-21. Le facteur de transcription impliqué est Bcl6 et ces cellules sécrètent principalement l'Il-21 et l'Il-4. Ces cellules permettent la coopération LB/LT et sont indispensables à la commutation de classe via le récepteur CXCR5. Elles participent donc à la réponse humorale.

Les **lymphocytes T régulateurs** (Treg) sont induits par l'Il-2 et le TFG- β . Le facteur de transcription impliqué est FoxP3, ces cellules sécrètent principalement le TFG- β et l'Il-10. Ces cellules sont indispensables à l'immunomodulation des cellules effectrices et favorisent la résolution de l'inflammation. Les cellules T régulatrice type 1 (Tr1) sont apparentées aux Treg. Elles sont capables de sécréter de l'Il-10 en l'absence d'expression de FoxP3.

L'activation et la polarisation des LT conduit à une expansion clonale et une migration de ces cellules sur le site de l'infection afin de lutter contre l'agresseur. A l'issue de la rencontre avec l'agresseur, la contraction clonale réduit les cellules CD4 en un faible nombre de lymphocytes constituant les cellules mémoires.

II. A. c. 2. iv. Les sous-populations lymphocytaires T CD8+

La polarisation des LT CD8 dépend du signal cytokinique issu des LT CD4.

La principale polarisation observée est de type **T cytotoxique** (TC) induite par les cytokines de type T_H1 : IFN- γ et Il-2. Un signal de costimulation supplémentaire impliquant le CD40/CD40L est également nécessaire à cette polarisation. La collaboration T_H1/TC permet l'expansion clonale supportée par l'Il-2. L'IFN- γ favorise la différenciation optimale du T CD8 en TC au cours de laquelle les cellules acquièrent leur capacité de sécrétion de molécules cytotoxiques : perforine et granzymes A et B. Suite à la reconnaissance de la cellule cible via le complexe CMH-I-peptide, la perforine va créer des trous dans la membrane de la cellule cible, le granzyme va pénétrer la cellule à travers ces perforations et induire l'apoptose de la cellule. La cytotoxicité passe aussi à travers l'interaction Fas/FasL qui induit l'apoptose médiée par les caspases. Les TC sécrètent de grandes quantités d'IFN- γ qui participent à l'action antivirale et favorisent la polarisation M1 des macrophages. Les TC sont ainsi impliqués dans les réponses antivirales et antitumorales.

D'autres populations T CD8 peuvent être définies. Les T CD8 exprimant uniquement l'IFN- γ sont qualifiés de T CD8 activés. Ces cellules ne possèdent pas de propriétés cytotoxiques directes mais orientent la réponse immunitaire vers la cytotoxicité.

Comme les T CD4, lors de la résolution de l'infection, la majorité des T CD8 meurt par apoptose lors de la contraction clonale pour ne laisser qu'un petit nombre de cellules constituant les cellules mémoires.

II. A. c. 3. Lymphocytes B

La deuxième population lymphocytaire impliquée dans la réponse adaptative est la population des lymphocytes B (LB). Ils sont responsables de la réponse à médiation humorale. La réponse humorale peut être thymo-indépendante, c'est-à-dire non dépendante des LT, ou bien thymo-dépendante. C'est sur cette dernière que nous nous focaliseront.

II. A. c. 3. i. Ontogénie des lymphocytes B

Les progéniteurs B sont présents dans la moelle osseuse. Ils se différencient et mûrissent de façon indépendante de l'antigène et forment les LB matures naïfs possédant une immunoglobuline de surface spécifique. Cette immunoglobuline (Ig) constitue le BCR du LB. L'Ig peut être membranaire (Ig de surface) ou bien sécrétée (anticorps). La diversité des BCR résulte de mécanismes de remaniements génétiques aléatoires (mécanismes de diversité combinatoire et jonctionnelle) et constitue le répertoire B.

Les LB matures naïfs migrent ensuite vers les OL-II.

II. A. c. 3. ii. Activation des LB

L'activation des LB naïfs repose sur l'association de trois signaux.

Les LB naïfs circulent dans les OL-II jusqu'à ce qu'ils rencontrent l'antigène natif dont ils possèdent le BCR spécifique. Cette rencontre **BCR-antigène** a lieu dans la zone corticale des ganglions lymphatiques drainant et constitue le premier signal d'activation du LB. En effet, les cellules stromales en zone corticale produisent la chimiokine CXCL13 qui vont attirer les LB via le récepteur CXCR5 alors qu'en zone para-corticale, elles produisent les chimiokines CCL19 et CCL21 qui vont permettre d'attirer des LT via leur récepteur CCR7.

Lors de la reconnaissance antigène spécifique-BCR, le LB va produire le CCR7 conduisant à sa migration vers la zone jonctionnelle B/T (corticale/para-corticale). En parallèle, la présentation antigénique via les CPA aux LT CD4 naïfs va induire la polarisation de certains LT en T_{FH} qui perdent le CCR7 pour exprimer le CXCR5. Ces T_{FH} vont migrer en zone jonctionnelle et aller rencontrer les LB qui viennent d'être activés. A ce moment, la **rencontre LB/LT** est appelée présentation croisée où le LB joue le rôle de CPA pour le LT préalablement activé par le même antigène et le T_{FH} constitue le deuxième signal indispensable à l'activation du LB.

Des signaux de **costimulation** sont également requis : CD80/CD86 (LB) avec CD28 (LT). L'interaction CD40/CD40L est indispensable à la commutation isotypique (switch de l'expression des IgM vers les autres classes d'anticorps, en particulier les IgG) et la formation des centres germinatifs (GC). Le LT produit également des signaux solubles nécessaires à la prolifération et la survie du LB : Il-4 pour la survie et Il-21 pour la maturation (commutation de classe, maturation d'affinité et différenciation en plasmocyte).

Cette activation supportée par les T_{FH} conduit à la formation des plasmablastes à demi-vie courte sécrétant d'IgM et une faible proportion de LB activés fondateurs à l'origine du centre germinatif.

II. A. c. 3. iii. Structure et rôle des centres germinatifs

Les centres germinatifs (Germinal Center en anglais, GC) ont pour but de faciliter l'interaction lymphocytes B et T de même spécificités afin de promouvoir une réponse adaptative efficace suite à un premier contact avec l'antigène. Les GC, apparaissant au sein des OL-II, sont les structures dans lesquelles les lymphocytes naïfs vont s'activer suite à l'exposition à l'antigène. Ils comportent deux zones : la zone sombre contenant les centroblastes, racine du GC et lieu de l'hypermutation somatique et la zone claire composée des centrocytes subissant l'expansion clonale des LB spécifiques d'antigène et la commutation isotypique sous la dépendance des T_{FH} et de l'IL-21 (Figure 2).

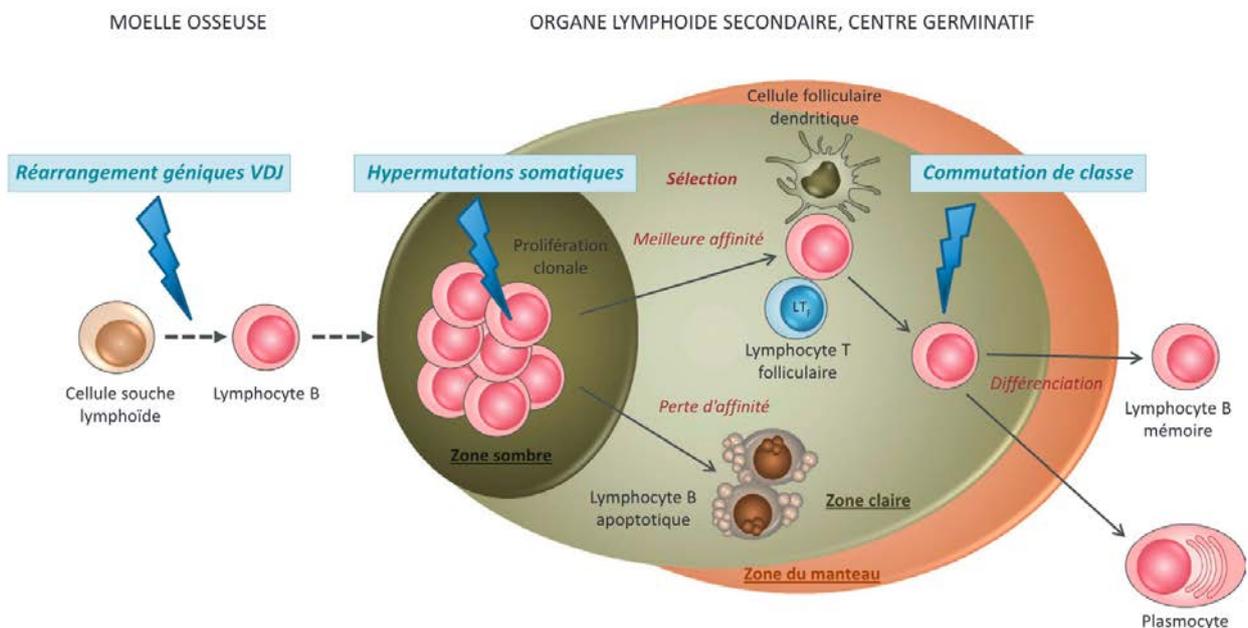


Figure 2 – Activation des LB au sein des centres germinatifs. Schéma tiré de « Immunologie fondamentale et immunopathologie », 2018 (1).

La commutation isotypique correspond au changement d'expression de classe (ou isotype) d'Ig : passage des IgM à l'expression d'IgG, IgA ou IgE. L'expression de telle ou telle classe d'Ig est variable suivant le tissu et l'environnement cytokinique. L'hypermutation somatique correspond à une maturation d'affinité du BCR pour l'antigène au travers de mutations dans les régions hypervariables des Ig.

Suite à ces deux phénomènes, les LB deviennent des plasmocytes capables de sécréter de grande quantité d'anticorps de haute spécificité pour l'antigène. Ces anticorps ont des fonctions cytolytiques directes, d'opsonisation ou de neutralisation de l'antigène.

II. A. c. 4. La réponse mémoire lymphocytaire

Suite à un premier contact avec un pathogène, la contraction clonale réduit drastiquement le pool des lymphocytes recrutés pour ne laisser qu'un petit nombre de cellules appelées cellules mémoires. Les lymphocytes T mémoires ont plusieurs spécificités qui les distinguent des cellules naïves. Elles ont la capacité de s'auto-renouveler et de se maintenir sur le long terme en l'absence d'antigène. Elles possèdent des propriétés migratrices accrues, notamment la capacité de circuler dans les tissus périphériques non-lymphoïdes (peau, poumon, intestin...). Leurs fonctions effectrices sont améliorées en termes de cytotoxicité et de sécrétion de cytokines. Ces propriétés permettent aux cellules mémoires de protéger l'hôte sur le long terme, à travers des réponses plus rapides et plus efficaces en cas de réinfection par un même pathogène. La population des cellules mémoires n'est toutefois pas homogène (**Figure 3**). Les lymphocytes mémoires se répartissent en i) T mémoire centraux (T_{CM}) ayant de forte capacité répliquative mais pas de fonction inflammatoire ou cytotoxique ; ii) T effecteur-mémoire (T_{EM}) circulant entre les organes lymphoïdes et les tissus et iii) T résident-mémoire (T_{RM}) présents exclusivement dans les tissus et constituant une première barrière en réponse à l'antigène sur le site de l'infection.

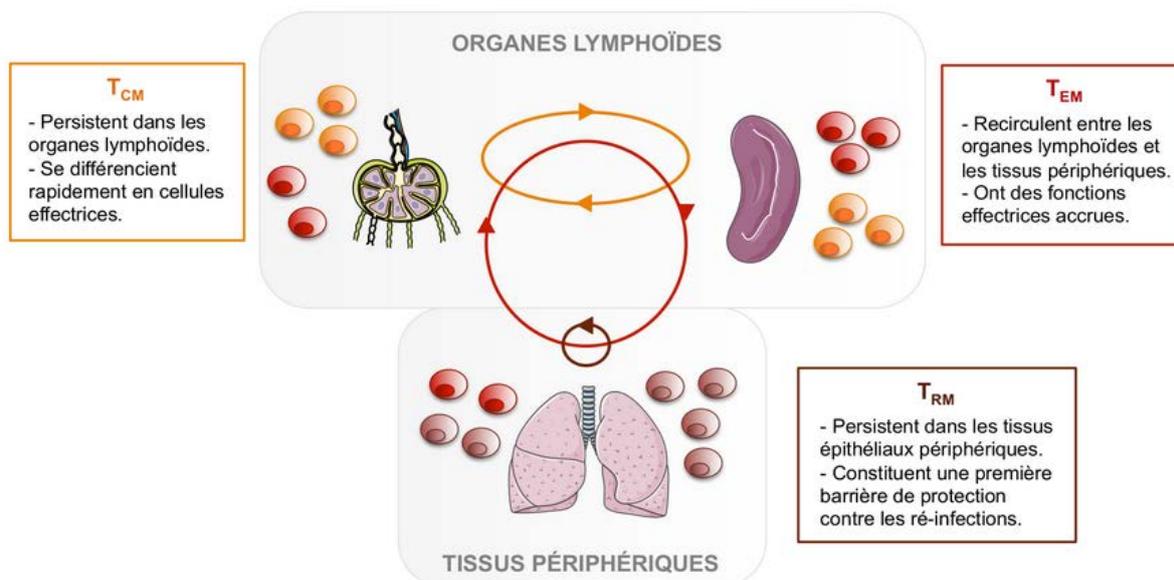


Figure 3 – Localisation et fonction des sous-populations lymphocytaires mémoires. (4)

II. B. Immunologie du poumon

Dans cette deuxième partie, nous allons nous intéresser à la réponse immunitaire se développant spécifiquement dans le poumon. Après des rappels de physiologie (5,6), nous décrirons les spécificités immunologiques de cet organe.

II. B. a. Le tractus respiratoire

Chaque jour, un adulte moyen inhale 10 000 L d'air. Ces 10 000 L sont vecteurs de micro-organismes, de polluants et autres particules diverses. Les voies aériennes remplissent donc un rôle de barrière important en plus de leur fonction primaire d'assurer les échanges gazeux.

Le tractus respiratoire se divise en deux parties : i) le tractus supérieur ou voies aériennes supérieures comprennent les cavités nasales, le pharynx et le larynx ; ii) le tractus inférieur ou voies aériennes inférieures ou profondes comprennent la trachée, les bronches souches et les poumons.

Les poumons sont des organes pairs situés dans la cavité thoracique entourés par une séreuse, la plèvre. Chaque poumon peut être divisé en deux lobes à gauche et trois lobes à droite. Les ramifications pulmonaires sont dichotomiques sur 23 embranchements en partant de la trachée pour finir par les alvéoles pulmonaires. Fonctionnellement, les niveaux de ramifications peuvent être divisés en deux entités distinctes : une partie **conductrice** allant des cavités nasales jusqu'aux bronchioles respiratoires et une partie destinée à la **diffusion** des gaz composée des alvéoles pulmonaires. A chaque ramification du tractus respiratoire le calibre diminue et la structure histologique évolue. L'ensemble du tractus respiratoire est revêtu d'une muqueuse respiratoire, reposant sur une membrane basale et soutenu par un tissu conjonctif, le chorion.

II. B. b. Un organe barrière

Dans cette partie, nous décrirons des mécanismes annexes de lutte contre les pathogènes, complémentaires à la réponse immunitaire proprement dite et aussi appelés mécanismes d'anté-immunité (**Figure 1**).

II. B. b. 1. Clairance muco-ciliaire

Dans la portion conductrice de l'arbre respiratoire se trouve l'**escalator muco-ciliaire**. Il s'agit du système de clairance des voies aériennes. Il repose sur l'association d'un tapis, le mucus, et d'un moteur, les cils.

Le **mucus** tapisse l'ensemble des voies de conduction. Il est produit par les cellules caliciformes à raison de 15 à 20 mL par jour. Il exerce trois fonctions : i) piéger les particules (effets « papier tue-mouche »), ii) humidifier l'air et iii) protéger les cellules épithéliales sous-jacentes. Il est principalement composé d'eau (95%) et de glycoprotéines, glycosaminoglycanes, protéines et ions. Le mucus s'organise en deux couches : une couche superficielle très visqueuse où repose l'extrémité des cils et une couche profonde plus fluide permettant le battement des cils (10-20 battements/s). Les **cils** exercent un mouvement mécanique pour faire remonter les particules afin qu'elles soient dégluties et éliminées. Le ralentissement de cet escalator muco-ciliaire est un risque majeur de prolifération ou de dissémination des pathogènes.

II. B. b. 2. Alvéoles

La portion alvéolaire est la portion distale de l'arbre respiratoire. Un adulte moyen possède 280 à 300 millions d'alvéoles correspondant à une surface estimée à 80 m². Schématiquement, on peut représenter une alvéole comme une poche comportant une paroi et un contenu.

La **paroi alvéolaire** est fine (6-10 µm) et donc fragile. Elle est en contact étroit avec la paroi des capillaires pulmonaires, l'ensemble constituant la barrière alvéolo-capillaire. Cette barrière est le lieu des échanges gazeux entre alvéoles et capillaires pulmonaires. L'épithélium alvéolaire est constitué à part égales de deux types cellulaires. i) Les **pneumocytes de type I**, couvrent 95% de la surface alvéolaire, ont des fonctions de diffusion passive et assurent une épaisseur minimale à la barrière alvéolo-capillaire. ii) Les **pneumocytes de type II** sont de grandes cellules sécrétant le **surfactant** indispensable pour éviter que les alvéoles ne se collabent entre chaque mouvement respiratoire et qui possède un rôle immunomodulateur notamment via les protéines SP (7).

Le contenu alvéolaire est constitué d'air et de cellules mobiles. Les cellules mobiles sont principalement des **macrophages alvéolaires** : ils représentent 2% des cellules totales du poumons. Ils sont l'ultime ligne de défense avant la circulation sanguine via leurs fonctions phagocytaires non spécifiques et permettent un relais dans la réponse immune. Des lymphocytes T et des polynucléaires neutrophiles sont également retrouvés dans les alvéoles mais ils sont peu nombreux à l'état physiologique. Les cellules mobiles sont les éléments récupérés lors de la pratique d'un lavage broncho-alvéolaire (LBA).

II. B. b. 3. Sécrétion de peptides antimicrobiens

Les cellules épithéliales sécrètent des molécules à effet **anti-microbien direct** visant à limiter la quantité de micro-organisme présent sur la muqueuse respiratoire. Ces molécules viennent enrichir la composition du mucus ou du surfactant dans les voies aériennes et possèdent un spectre d'hôte large. Les peptides antimicrobiens sont chargés positivement et viennent se fixer sur les pathogènes déstabilisant leurs enveloppes et aboutissant à leur mort. Le lysozyme va lyser le peptidoglycane des bactéries. La lactoferrine présente dans le mucus va chélater le fer indispensable à la croissance bactérienne. Les cellules glandulaires produisent également des mucines qui vont engluer les micro-organismes dans le mucus avant de permettre leur élimination à travers le tapis muco-ciliaire. Les cellules épithéliales peuvent produire des espèces réactives de l'oxygène présentant une activité antimicrobienne. Enfin, les cellules épithéliales participent également à la transcytose des IgA vers la lumière des voies aériennes.

II. B. c. Initiation des réponses innées

Les cellules de l'épithélium respiratoire sont capables d'initier les réponses de type innées, constitutives et rapidement inductibles (5). Les cellules épithéliales et les cellules immunitaires locales possèdent sur leur membrane des récepteurs PRR, le plus souvent de type TLR. Après fixation spécifique, une cascade de signalisation intracellulaire permet la production de médiateurs pro-inflammatoires permettant le trafic et l'activation cellulaire.

Lorsque l'agent microbien atteint le compartiment intra-cellulaire ou la couche basale, des signaux d'alertes vont être déclenchés par les cellules épithéliales et les macrophages alvéolaires, le profil et l'intensité de la réponse dépendant du type de pathogène reconnu. L'organisme met ainsi en place une réponse adaptée et proportionnelle à l'agression. L'Il-17 et

l'Il-22 tiennent conjointement un rôle important dans l'activation des cellules. Elles sont produites par des cellules lymphoïdes innées. L'action de ces cytokines a pour conséquence une amplification de la réponse inflammatoire notamment par le recrutement des PNN.

L'exposition permanente à des antigènes extérieurs suppose une fine régulation de la réponse immune pour limiter son activation perpétuelle. L'objectif est de maintenir l'intégrité tissulaire. Les cellules capables d'activer la réponse inflammatoire sont aussi dotées de mécanismes permettant de la maîtriser. Les cellules épithéliales régulent leur activation à travers l'Il-10 et le TFG- β afin de limiter les dommages tissulaires liés aux effecteurs de l'inflammation et de restaurer l'intégrité de la barrière alvéolo-capillaire. Elles produisent du GM-CSF pour limiter la réponse des cellules dendritiques (DC). De plus des molécules dérivées des acides gras poly-insaturés, appelées médiateurs pro-résolutifs, ont un rôle actif dans la résolution des mécanismes inflammatoires : diminution du recrutement des PNN et stimulation de la régénération tissulaire notamment. Les macrophages alvéolaires expriment faiblement le CMH-II limitant la présentation antigénique et produisent aussi de l'Il-10 immunomodulatrice. Isolément, l'Il-22 issue des cellules lymphoïdes locales participe aux mécanismes de régénération tissulaire suite aux lésions.

II. B. d. La réponse immune adaptative

Les réponses immunes innées et adaptatives ayant été précédemment développées (voir « Rappels d'immunologie générale »), nous nous focaliserons sur les structures lymphoïdes retrouvées au sein des poumons, les iBALT, et les cellules mémoires résidentes du poumon, les T_{RM} .

II. B. d. 1. BALT

Le Tissu Lymphoïde Associé aux Bronches (BALT) est un OL-II réparti le long du chorion des voies aériennes des mammifères, à l'instar des plaques de Peyer dans l'intestin. Les OL-II mettent en relation des lymphocytes B et T naïfs provenant du sang avec des antigènes, sans passage dans les tissus. Ces interactions sont facilitées par l'organisation des GC et aboutissent à la production de cellules effectrices. Cependant, chez l'Homme et la souris, le BALT n'est pas constitutif mais induit en réponse à divers stimuli de dangers ou microbiens.

On parle alors d'iBALT (8,9) ou de tissu lymphoïde ectopique (10) appartenant aux OL-III car non-issu d'un programme de différenciation embryonnaire.

II. B. d. 2. iBALT

Au sein de la muqueuse respiratoire, les iBALT sont localisés dans le tissu conjonctif appelé chorion. On les retrouve précisément en zone péri-bronchique et périvasculaire. Les iBALT ont une structure proche des OL-II : un centre germinatif composé d'une zone B entourée de la zone T structurée par des cellules stromales (**Figure 4**) (11).

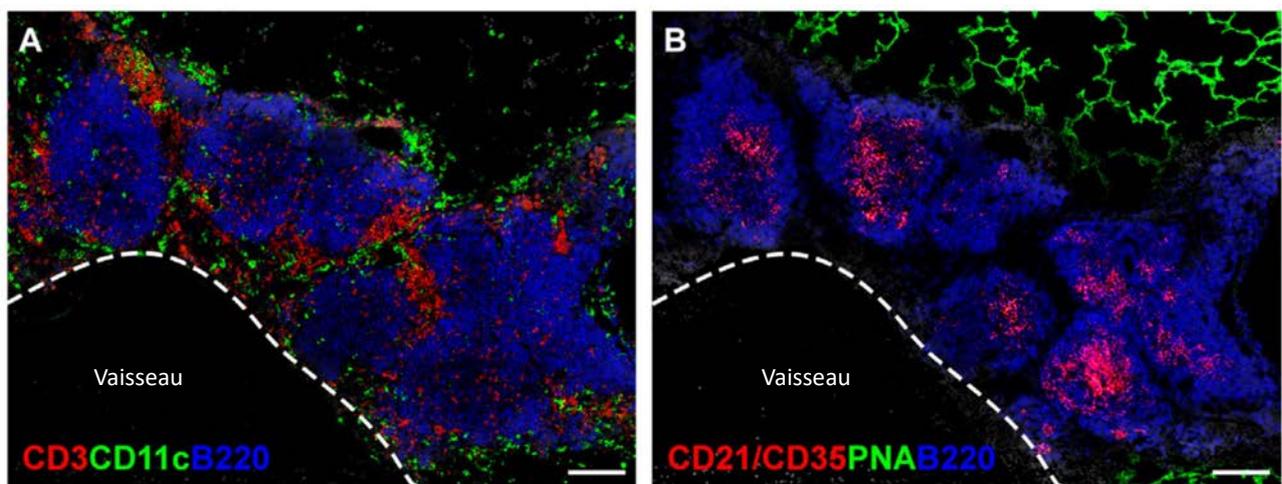


Figure 4 – Structure des iBALT. Images de microscopie confocale (fusion des plans) obtenues après induction d'iBALT chez des souris C57BL/6 par du LPS par Hwang *et al.* (11). A. Les iBALT sont composés au centre de lymphocytes B (B220+) entourés de LT (CD3+) et de cellules dendritiques conventionnelles (CD11c+). B. On visualise la zone B constituée de LB (B220+) et des cellules folliculaires dendritiques (CD21/CD35+). Échelle : 200 μ m.

En zone B, les cellules stromales sont appelées cellules dendritiques folliculaires (exprimant CD21, CXCL13) et font parties des cellules fibroblastiques spécialisées. En zone T, les cellules stromales sont plutôt des cellules fibroblastiques réticulaires qui expriment CCL19 et CCL21 pour attirer les T naïfs et les DC et produisent l'Il-7 pour la survie des lymphocytes naïfs (11). La zone B comporte, en plus des lymphocytes B, des T_{FH} pour la coopération B/T et la zone T comporte des T CD4 et T CD8 ainsi que des DC classiques (11). Les iBALT arborent également des veinules à haut endothélium (HEV) exprimant des chimiokines attirant les lymphocytes naïfs comme CCL21, ces cellules expriment à leur surface la PNAd (adressine périphérique des ganglions lymphatiques) un marqueur retrouvé dans les ganglions. Enfin des vaisseaux lymphatiques sont aussi retrouvés dans les iBALT permettant la recirculation des lymphocytes effecteurs et mémoires produits (11).

Alors que les OL-II se développent exclusivement lors de la période embryonnaire, les iBALT ne commencent à apparaître qu'après la naissance suite aux premières expositions aux antigènes respiratoires (11). Il a été montré que les iBALT étaient particulièrement produits en période néonatale chez la souris (12) et l'Homme (11). Cette formation a été rapportée en réponse à des stimuli inflammatoires et à des infections bactériennes ou virales (11,13–15). La taille, forme et le nombre d'iBALT sont variables suivant l'antigène et la durée d'exposition (11). L'interaction CCL13/CXCR5 est indispensable à la formation de la zone B comme dans les OL-II (11). CCR7, CCL19 et CCL21 sont essentiels pour la zone T et les HEV. CCL19 et CXCL13 sont d'abord sous le contrôle de l'IL-17 (issu des T_H17) pendant la phase de formation de l'iBALT, puis après la résolution de l'inflammation, ces molécules sont sous le contrôle de lymphotoxines dans le but de maintenir la structure. Les cellules stromales de la zone B expriment le récepteur de l'IL-22. Cette cytokine est aussi indispensable à la formation des iBALT, contrairement aux ganglions lymphatiques. Les PNN participent à la formation de l'iBALT via la production d'IL-21 permettant le maintien des B activés (11). Les DC CD11c positives jouent un rôle dans la formation et le maintien de l'iBALT. Les Treg peuvent au contraire limiter la formation des iBALT.

Après sa formation pendant la phase inflammatoire, l'iBALT est maintenu en l'absence de l'antigène grâce à des mécanismes homéostatiques produit par l'iBALT lui-même (11). L'iBALT jouera alors le même rôle qu'un centre germinatif classique et pourra activer des LB de spécificités différentes de l'antigène ayant induit l'iBALT. La présence de l'iBALT permet une clairance plus rapide des virus et une production accélérée d'Ac au niveau pulmonaire (9). L'iBALT semble avoir des effets bénéfiques en contexte infectieux (13). Les mécanismes d'action suspectés sont i) la formation de vaisseaux lymphatiques autour des iBALT facilitent la circulation des cellules et forment une niche pour les T CD4 mémoires et ii) un rôle de séquestration des antigènes permettant de limiter l'inflammation et les lésions associées (11). Dans le contexte de pathologies chroniques pulmonaires (BPCO, pneumopathies d'hypersensibilité, asthme), les iBALT semblent associés aux dommages tissulaires (13).

II. B. d. 3. Lymphocytes mémoires résidents

Suite à une première rencontre avec l'antigène, une partie des lymphocytes deviendront des lymphocytes résidents mémoires. Pour la population lymphocytaire T, on parle de T_{RM}. Ces

cellules sont retrouvées dans les tissus périphériques barrières (tube digestif, peau, tractus respiratoire), non barrières (foie, cerveau) et lymphoïdes (16). Elles sont maintenues grâce à l'expression à la surface cellulaire de molécules de résidence : CD103, CD69, CD49a, CXCR3. A l'inverse, les T_{RM} sous-expriment les marqueurs de fuite tissulaire CD62L et CCR7. Les T_{RM} constituent la sous-population des cellules mémoires la plus abondante dans les organes périphériques.

Les T_{RM} sont présents dans les tractus respiratoires inférieur et supérieur (17,18). Dans les poumons, ils sont présents aussi bien dans les voies aériennes que dans le parenchyme. Les T_{RM} offrent une **protection immédiate** contre les infections virales ou bactériennes (17) de par leurs fonctions effectrices rapides (cytotoxicité, production de cytokines). Ils possèdent également une fonction de détection et de **transmission** des signaux d'alarme en cas d'infection.

Les T_{RM} CD8, bien décrits dans la littérature, peuvent être caractérisés par la co-expression du marqueur CD69 et de CD103. Les T_{RM} CD8 ont la spécificité d'avoir une demi-vie tissulaire plus courte que les autres T_{RM}. Suite à des dommages tissulaires, les T_{RM} CD8 peuvent se multiplier temporairement dans des niches appelées dépôts de cellules mémoires associés aux lésions (Repair Associated Memory Depots, RAMD). Ils sont également issus des T_{EM} circulants.

Les T_{RM} CD4, moins étudiés, sont principalement localisés dans les iBALT au même titre que les B résidents mémoires, B_{RM}. Ils sont caractérisés par l'expression de CD69, +/- CD103.

II. B. e. Le Microbiote respiratoire

Le poumon a été considéré comme indemne de bactérie par le passé mais en pratique il possède une flore de même diversité que le tractus respiratoire supérieur en quantités moindres.

Les techniques d'étude du **microbiote** ont très largement évolué ces dernières années, passant des méthodes basées sur la culture à des techniques moléculaires de nouvelle génération basées sur l'ARN 16S. Les *phyla* bactériens prédominants sont les *Bacteroidetes*, *Firmicutes* et *Proteobacteria*. Les genres dominants sont *Prevotella*, *Veillonella*, *Pseudomonas*, *Fusobacteria* et *Streptococcus* (19). L'origine présumée de cette flore est le tractus respiratoire supérieur qui diffuse vers les voies inférieures lors de la respiration.

Les questions actuelles au sujet du microbiote pulmonaire concernent son implication dans les réponses immunes et l'effet de la modulation de celui-ci sur les pathologies respiratoires. Bien que les poumons soient fortement exposés aux allergènes, polluants et pathogènes divers, la réponse inflammatoire reste peu importante dans cet organe. Le microbiote respiratoire semble jouer un rôle dans l'inhibition des phénomènes allergiques chez l'adulte et des réactions excessives en réponses aux infections virales mais aussi dans la promotion du turnover des cellules immunitaires du poumon.

Depuis quelques années, **l'axe intestin-poumon** est décrit comme ayant un lien avec l'immunité (20). En effet, des pathologies respiratoires chroniques sont associées à des perturbations de la flore digestive. Les infections virales sont également souvent accompagnées de signes digestifs. Le microbiote digestif joue un rôle dans la génération de LT CD4 et CD8 spécifique du virus *influenzae* par exemple (21). De plus, il est montré que les dysbioses favorisent l'asthme chez l'Homme (22).

Plus récemment, le **mycobiote** respiratoire a intéressé la communauté scientifique (23). Les études sont à ce jour peu nombreuses. On sait cependant que certains champignons sont présents dans le tractus respiratoire, aussi bien chez des sujets sains que des sujets malades.

Les espèces retrouvées sont variables d'un individu à un autre et sont le résultat de l'inhalation de champignons issus de l'environnement. Les espèces les plus retrouvées chez un sujet sain sont : *Cladosporium sp.*, *Eurotium sp.*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus sp.*, *Candida sp.*, *Neosartorya sp.*, *Malassezia sp.*, *Hyphodontia, sp.* *Kluyveromyces sp.*, et *Pneumocystis sp.*.

Certains états pathologiques sont associés à une réduction de la diversité du mycobiote respiratoire. Le portage de champignon est évalué en pratique clinique chez des patients atteints de pathologie chronique comme dans le cadre de la mucoviscidose ou la BPCO. Il sera tout à fait bénin de retrouver plusieurs espèces de *Candida sp.* en culture pouvant coloniser l'arbre respiratoire. La pousse d'un champignon filamenteux sera en règle générale le résultat de l'inhalation de spores environnementales. La présence de *Pneumocystis* détectée en PCR peut être due à un portage en l'absence de signe clinique (voir « Portage de *Pneumocystis* »).

II. C. Place de *Pneumocystis* en santé humaine

II. C. a. Biologie du champignon

II. C. a. 1. Taxonomie

Pneumocystis a tout d'abord été décrit dans les poumons de cochon d'Inde par Chagas (24) et de rat par Carini en 1909 et fut assimilé à un nouveau stade du genre *Trypanosoma*. C'est en 1912 que le micro-organisme a été considéré comme une espèce à part entière et nommé *Pneumocystis carinii* (25). On parlait alors de *P. carinii* de l'Homme, de la souris ou du rat. En 1976, Frenkel proposa la dénomination *P. jirovecii* pour l'espèce infectant l'Homme (26). Après les années 80, les analyses moléculaires ont permis de classer *Pneumocystis* parmi le règne des *fungi*, plus spécifiquement des ascomycètes (27,28). Enfin, la notion de spécificité d'hôte pour *Pneumocystis* est apparue. La **spécificité d'hôte** correspond au fait qu'une espèce de *Pneumocystis* particulière ne peut infecter qu'une espèce de mammifère spécifique et est donc incapable d'infecter d'autres mammifères en dehors de leur hôte habituel (29). Ainsi, *P. jirovecii* n'est retrouvé que chez l'Homme, *P. murina* chez la souris et *P. carinii* ou *P. wakefieldiae* chez le rat. Ces évolutions taxonomiques historiques sont responsables d'une hétérogénéité des appellations retrouvées dans la littérature.

II. C. a. 2. Formes du champignon

Pneumocystis est un champignon ubiquitaire qui existe sous deux formes principales (30). Les **formes trophiques** (anciennement trophozoïtes) mesurent 1 à 8 μm et sont présentes à la surface des alvéoles. Elles sont dotées d'élongations permettant l'adhésion aux pneumocytes de type I, indispensable à la multiplication du champignon. C'est la forme majoritaire pendant l'infection (10 formes trophiques pour 1 asque) (30). L'**asque** (anciennement kyste) de forme ovoïde mesure 8 à 10 μm et peut contenir 2, 4 ou 8 ascospores selon la maturité de l'asque.

II. C. a. 3. Cycle

Pneumocystis possède un tropisme pulmonaire et les différentes formes sont retrouvées quasi exclusivement à la surface de l'épithélium alvéolaire. L'adhésion de *Pneumocystis* à l'épithélium alvéolaire est indispensable à la multiplication du champignon. *Pneumocystis* n'est pas présent à l'intérieur des cellules et les disséminations systémiques sont extrêmement rares.

L'une des raisons aux difficultés de positionnement taxonomique de *Pneumocystis* est son caractère non cultivable sur milieux gélosés. Cela a pour conséquence de limiter l'acquisition des connaissances en particulier concernant la détermination du cycle de multiplication du champignon. Aujourd'hui un cycle théorique est admis par la communauté scientifique. Ces étapes restent à l'état de descriptions microscopiques en l'absence de modèle de culture de *Pneumocystis* et sont compatibles avec les cycles d'autres ascomycètes.

Il existe deux cycles de reproduction (30) (Figure 5).

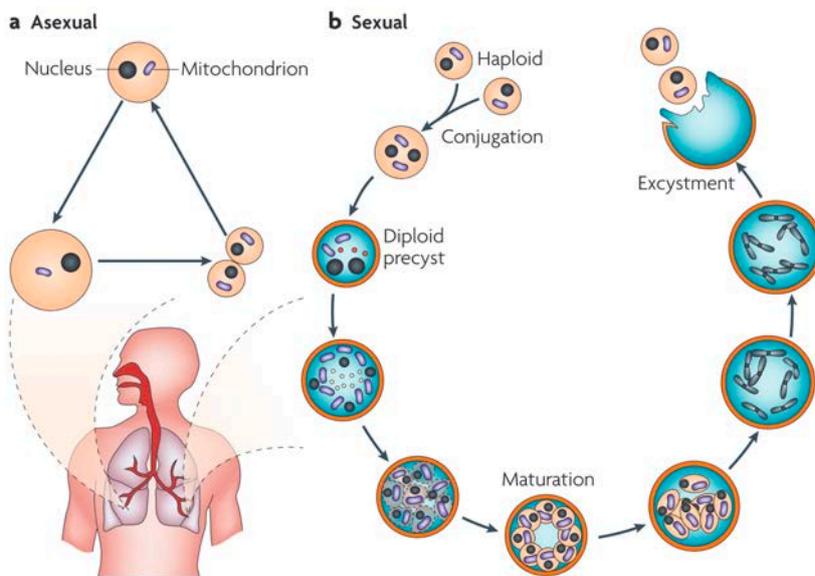


Figure 5 - Cycle théorique de multiplication de *Pneumocystis jirovecii*. a. cycle asexué. b. cycle sexué. Schéma de Thomas *et al.* (30)

Après inhalation des asques, les ascospores sont libérées dans les alvéoles par excystation. Les ascospores se transforment en formes trophiques et vont adhérer aux pneumocytes de type I et se multiplier. Les formes trophiques formeront de nouveaux asques par conjugaison qui, après maturation, libéreront de nouvelles ascospores. Le passage de la forme trophique haploïde à la forme asque représente le cycle **sexué** (Figure 5B) (31). En parallèle, une petite proportion de formes trophiques se multiplient par fission binaire : c'est le cycle **asexué** (Figure 5A).

II. C. b. Acquisition de *Pneumocystis*

Aujourd'hui, l'hypothèse d'une **infection de novo** est retenue chez l'Homme, l'hôte étant régulièrement réinfecté par de nouvelles souches de *Pneumocystis jirovecii* au cours de la vie. Cette idée est appuyée par le fait i) qu'un individu développant une pneumocystose élimine

le champignon après résolution de la maladie et ii) que différentes souches soient détectées chez un même sujet lors d'épisodes différents de pneumocystose (32).

La première rencontre entre un individu et *Pneumocystis* est précoce au cours de la vie. En effet, à l'âge de 20 mois, environ 85% des enfants ont développé des anticorps dirigés contre le champignon, témoin d'un contact avec le microorganisme (33). Ponce *et al.* ont démontré que le portage asymptomatique était extrêmement fréquent (> 50%) dans la population générale immunocompétente (34). Ainsi, notre système immunitaire rencontre régulièrement le champignon et ce n'est qu'à l'occasion d'une immunodépression que ce nouveau contact entraîne une pneumocystose. De ce fait, lorsqu'un patient est atteint de pneumocystose, son système immunitaire n'est pas naïf vis-à-vis de *Pneumocystis jirovecii*.

La **transmission inter-individuelle** a été démontrée chez l'Homme (35) et dans les modèles animaux où elle est mise à profit comme méthode d'infection expérimentale (voir « Mode d'infection des animaux »). Cette transmission inter-individuelle est également la source d'épidémie en milieu hospitalier comme décrit dans cette revue récente de Dellière *et al.* (36), les services de transplantation d'organes étant les plus touchés. Dans ces travaux, le typage moléculaire des souches impliquées a montré la présence quasi-systématique d'un génotype prédominant (36). Ces épidémies soulignent un possible rôle du personnel soignant dans la transmission de *Pneumocystis*. Suite à cette observation, l'HAS préconise la mise en place de moyens de prévention reposant sur l'isolement des patients positifs en PCR et le port de masque chirurgicaux dans les services à risques (37). Une contamination par *Pneumocystis* liée à un réservoir environnemental est peu probable. En effet, il n'est pas retrouvé dans les sols (38) mais uniquement dans l'environnement proche de sujets porteurs du champignon (39) : le réservoir est donc strictement humain.

La forme de transmission a été identifiée par l'équipe de Cushion en 2010 (40). Ils ont montré qu'en éliminant les asques par traitement avec une échinocandine, le champignon n'était plus transmissible d'un hôte mammifère murin à un autre. A cette démonstration indirecte s'ajoute une démonstration directe par l'équipe de Chabé en 2013 (41), où le tri en cytométrie des formes trophiques et des asques montrent que la transmission est médiée par cette dernière. La forme **asque** semble donc être responsable de la transmission inter-individuelle.

II. C. c. Portage de *Pneumocystis*

Comme dit précédemment, *Pneumocystis* est ubiquitaire et retrouvé de façon asymptomatique chez des individus sains : enfants, adultes, personnels soignants. Cela signifie

donc que le champignon peut être présent dans les poumons d'un hôte sans provoquer de symptômes : on parle alors de portage ou de colonisation à *Pneumocystis*. La quantité de champignon étant en règle générale faible, la détection d'un sujet porteur nécessite le recours à la PCR sur les prélèvements respiratoires.

Le portage de *Pneumocystis* est retrouvé de 15 à 20% chez : i) des sujets atteints de pathologies chroniques type BPCO, d'infection par le VIH, de maladies auto-immunes, de pathologies malignes, des femmes enceintes, des enfants en bas âge, des transplantés d'organe ; ii) des sujets recevant des traitements à base de corticostéroïdes, d'immunothérapie anti-TNF α ou d'autres immunosuppresseurs ; iii) ou des sujets présentant des facteurs de risque cliniques tels qu'un faible taux de CD4, un tabagisme, un historique récent de pneumocystose ou un défaut de prophylaxie anti-*Pneumocystis* (42).

La colonisation par *Pneumocystis* peut avoir des conséquences sur le développement ou la transmission de la pneumocystose ou bien participer à la progression d'une pathologie pulmonaire préexistante. Une phase de colonisation pourrait précéder la maladie chez un individu et motive donc la mise en place d'une prophylaxie anti-*Pneumocystis* chez un individu pour prévenir la pneumocystose. Les sujets porteurs sains représentent un potentiel réservoir du champignon pouvant participer la transmission du micro-organisme. La colonisation par *Pneumocystis* serait aussi un facteur favorisant l'évolution de la BPCO (43).

II. C. d. Pathologie : la pneumocystose

Pneumocystis est un champignon opportuniste. Alors que chez un sujet immunocompétent, le champignon est éliminé sans symptôme, un sujet immunodéprimé pourra développer la maladie appelée « pneumocystose » ou « pneumonie à *Pneumocystis* » (PCP).

II. C. d. 1. Historique

Les premières descriptions de PCP humaines remontent aux années 1950 par Vanek et Jirovec (44) qui isolèrent *Pneumocystis* chez des enfants malnutris. Au début des années 1980, l'émergence d'un nombre anormalement élevé de cas de PCP au sein de la communauté homosexuelle masculine aux États-Unis (45,46) a attiré l'attention du Centre de contrôle des maladies aux États-Unis. Cela conduisit à l'identification du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), conséquence de l'infection par le VIH.

II. C. d. 2. Épidémiologie

La PCP était une pathologie rare avant les années 1980. Au cours des années 1980 et jusqu'à l'avènement des trithérapies antivirales, la PCP était quasi-exclusivement décrite chez des patients VIH positifs. Durant cette période, on considérait que deux tiers des patients entraient dans le stade SIDA au travers d'une PCP (47). Elle était alors la première cause de décès des patients VIH positifs. Les études de la fin des années 1980 estimaient une prévalence de 75% d'épisodes de PCP chez les sujets VIH positifs aux États-Unis et en Europe. Depuis l'usage des trithérapies, la prévalence n'a cessé de décroître dans cette population bien que la PCP reste encore la première pathologie opportuniste classante au stade SIDA chez les VIH positifs (48). En France, de 2012 à 2018, 19,3% des PCP déclarées l'étaient chez un VIH positif (49).

A l'heure actuelle, la PCP touche plus de 500 000 personnes à travers le monde chaque année et est la deuxième infection fongique invasive (IFI).

En France également, la PCP est en deuxième position dans le classement des IFI (20%) (49). Elle touche des sujets dont l'âge médian est de 62 ans, plutôt de sexe masculin (sex ratio H:F 1,8). Suite à l'avènement des trithérapies antivirales, la PCP est désormais plus fréquente chez les immunodéprimés VIH négatifs, toutes origines confondues. Les PCP déclarées en France de 2012 à 2018 au sein du réseau RESSIF (49) se répartissaient en 19,3% chez des patients VIH positifs, 15% chez des greffés d'organe solide, 46,8% chez des patients atteints d'une pathologie maligne, le plus souvent hématologique. A l'heure actuelle, l'essentiel des patients présentant une PCP est négatif pour le VIH mais 75 à 80% d'entre eux ont été traités par corticothérapie (50).

Malgré une thérapeutique adaptée (voir « Traitement et prophylaxie »), la mortalité de la PCP est de 20 à 30% (18,7% à un mois du diagnostic d'après les données RESSIF) (49). La mortalité est de 10% chez les VIH positifs alors qu'elle atteint 30 à 40% chez les VIH négatifs, voire 60 à 70% en cas de recours à la ventilation mécanique (47).

II. C. d. 3. Populations à risque

Les déficits immunitaires impliquant la **lignée lymphoïde** entraîne un risque important de développement de PCP (51). La lymphopénie T CD4 est le facteur de risque le plus communément cité. On retiendra la valeur de **200 éléments/mm³** comme étant le seuil en deçà

duquel le risque de PCP est majeur si le déficit est prolongé chez un patient vivant avec le VIH (29).

Les états pathologiques ou iatrogènes à risques sont :

- L'infection par le VIH,
- Les hémopathies malignes ou cancers solides,
- Les greffes d'organes solides ou de cellules souches hématopoïétiques,
- Les maladies auto-immunes,
- Les déficits immunitaires,
- La corticothérapie (à forte dose et/ou au long cours) et,
- Les traitements immunosuppresseurs plus largement.

II. C. d. 4. Clinique

La PCP est une atteinte pulmonaire basse caractérisée par une triade symptomatique associant **fièvre, toux sèche et dyspnée**.

La présentation clinique est variable suivant le type d'immunodépression du sujet infecté. L'équipe de Limper *et al.* a montré des différences de charges fongiques et d'inflammation dans le LBA des patients VIH positifs et négatifs (52). Ces données expliquent les différences de présentation clinique entre ces deux populations de patients. Ces différences sont illustrées dans la **Figure 6**. Chez le sujet VIH positif, les symptômes sont d'évolution subaigüe avec une charge fongique élevée. On décrit, chez le VIH négatif, des formes plus aiguës et sévères de PCP pouvant rapidement évoluer vers un syndrome de détresse respiratoire aiguë (53) alors que la charge reste faible. La toux est parfois d'abord discrète chez ces patients (53). L'insuffisance respiratoire nécessite fréquemment une hospitalisation en soins intensifs (50%) (54). La mortalité est 3 fois supérieure chez les VIH négatifs. Une co-infection avec le cytomégalovirus peut être retrouvée dans 50% des cas (54).

Présentation	VIH +	VIH -
Durée des prodromes	28 jours	< 7 jours
Mode de début	Progressif	Brutal
Clinique	Non spécifique (toux sèche, dyspnée, fièvre)	Non spécifique (toux sèche, dyspnée, fièvre)
PaO ₂ moyenne à l'AA	69 mmHg/9,2 kPa	50 mmHg/6,6 kPa
Recours à la VM	+	+++ (60-70% des cas)
Charge en <i>Pneumocystis jirovecii</i>	Importante	Faible
Mortalité	Environ 10% (si pas de VM)	Environ 30 à 60%
Sensibilité diagnostique du LBA	Excellente (environ 95%)	Faible
Neutrophilie au LBA	Faible	Elevée

Figure 6 – Différences de clinique entre un patient VIH positif et un patient VIH négatif atteints de PCP.
(29) VM : ventilation mécanique, AA : air ambiant, LBA : lavage broncho-alvéolaire

Les images radiographiques (**Figure 7**) rapportent une pneumopathie interstitielle diffuse bilatérale, l'infection atteignant la totalité du parenchyme pulmonaire. Le scanner est l'examen de choix pour le diagnostic de PCP. Il montre classiquement des plages de verre dépoli et parfois un « crazy paving » résultant de l'épaississement des septa interlobulaires (29). La radiographie thoracique des patients VIH positifs est plus caractéristique que chez le VIH négatif (54).

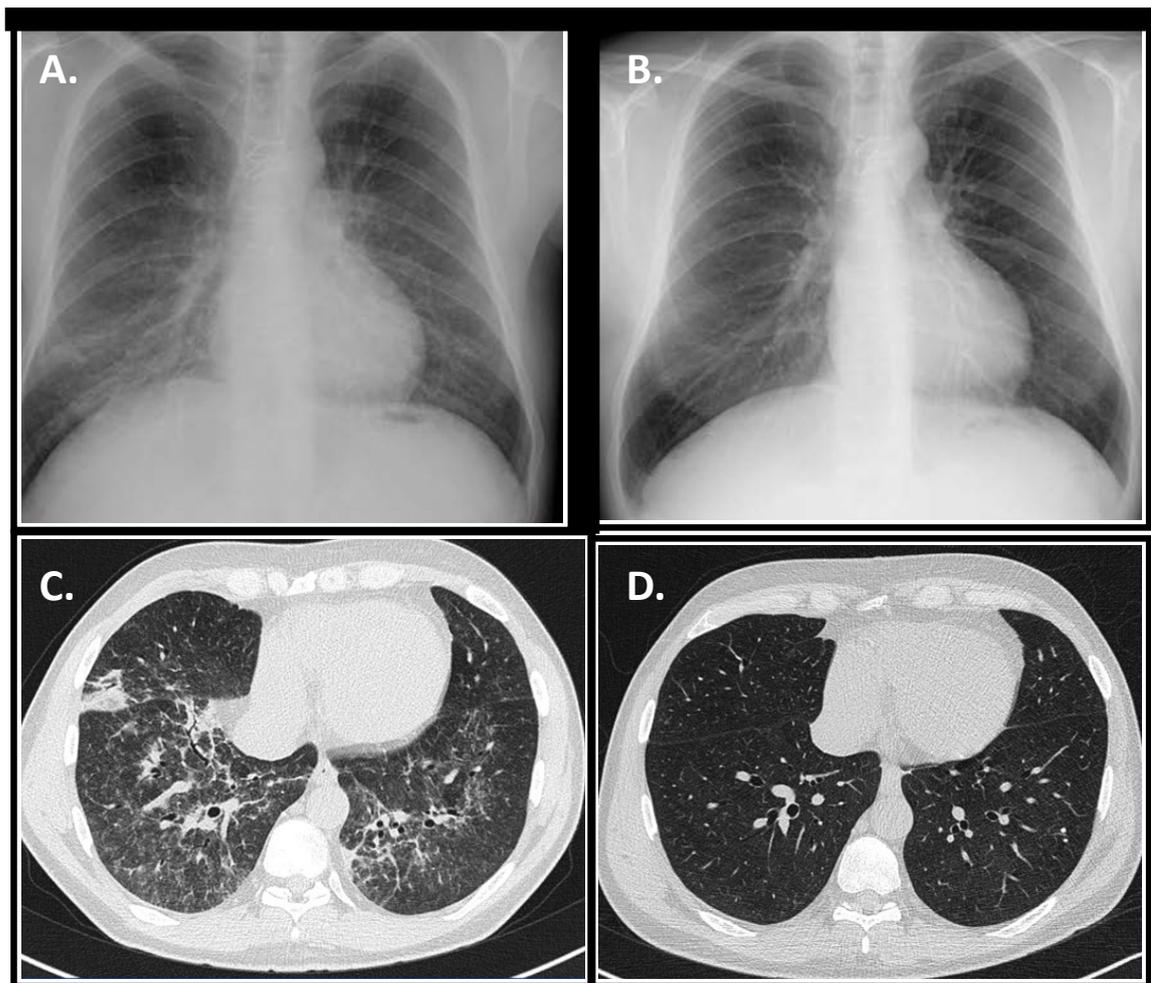


Figure 7 - Exemple d'anomalies radiologiques observées lors de la PCP. A. Radiographie thoracique pathologique avec syndrome interstitiel en base droite : les poumons légèrement blancs laissent apparaître les ramifications respiratoires, les culs de sac pleuraux sont mal dessinés. B. Radiographie thoracique de référence : les poumons apparaissent bien noirs et les culs de sacs pleuraux sont libres (noirs). C. Scanner thoracique pathologie avec plages en verre dépoli et bronchectasie par traction. D. Scanner thoracique après 21 jours de traitement, normalisation des lésions. Images provenant du CHRU de Brest.

Rarement, chez le patient VIH positif, le champignon peut disséminer de façon systémique et atteindre tous les organes dont la rate (47).

II. C. d. 5. Physiopathologie

Pneumocystis ne possède pas de réel facteur de virulence et n'a pas d'effet cytolytique décrit. C'est la **réponse immunitaire de l'hôte** qui tient une place centrale de la physiopathologie de l'infection. Limper *et al.* ont démontré chez la souris que la gravité de la PCP est liée, non pas à la charge fongique alvéolaire, mais à l'inflammation pulmonaire (52,55). Bien qu'indispensable à la résolution de la PCP, la réponse immunitaire peut également être délétère dans certaines circonstances, entraînant une inflammation responsable du

développement de lésions pulmonaires. Alors que chez un individu immunocompétent, le champignon est rapidement éliminé de l'environnement alvéolaire, ce mécanisme est inopérant chez les patients immunodéprimés. Le champignon va ainsi se multiplier et créer une forte inflammation locale. Cette réponse engendre un épaissement de l'épithélium alvéolaire, bloquant les échanges gazeux. Il en résulte une hypoxie et une insuffisance respiratoire.

II. C. d. 6. Diagnostic biologique

Devant des arguments clinico-radiologiques, une recherche de *Pneumocystis* doit être réalisée.

II. C. d. 6. i. Prélèvements

Le diagnostic biologique sera posé après réalisation de prélèvements respiratoires. Le **lavage broncho-alvéolaire** (LBA) est le prélèvement de choix. Il consiste à instiller un volume donné de sérum physiologique à l'aide d'un fibroscope et de ré-aspirer ce liquide en entraînant les cellules mobiles du compartiment alvéolaire et les éventuels pathogènes présents. La sensibilité est de 80 à 100% mais elle peut diminuer en cas de volume injecté trop grand (55). Des expectorations induites peuvent aussi être réalisées, elles ont une bonne sensibilité (90%).

II. C. d. 6. ii. Microscopie

Le diagnostic microscopique permet de mettre en évidence directement le champignon.

La coloration au bleu de Toluidine (**Figure 8A**) ou l'imprégnation argentique Gomori-Grocott (**Figure 8B**) permettent de mettre en évidence les asques.

La coloration de May-Grünwald Giemsa (**Figure 8C**) met en évidence les formes trophiques, les ascospores ainsi que les amas spumeux contenant les asques. Le diagnostic microscopique peut également être réalisé après marquage par immunofluorescence indirecte (IFI) utilisant des anticorps spécifiques anti-*Pneumocystis* couplés à la fluorescéine. Cette technique met en évidence les asques de *Pneumocystis* (**Figure 8D**). C'est la plus sensible des techniques de microscopie.

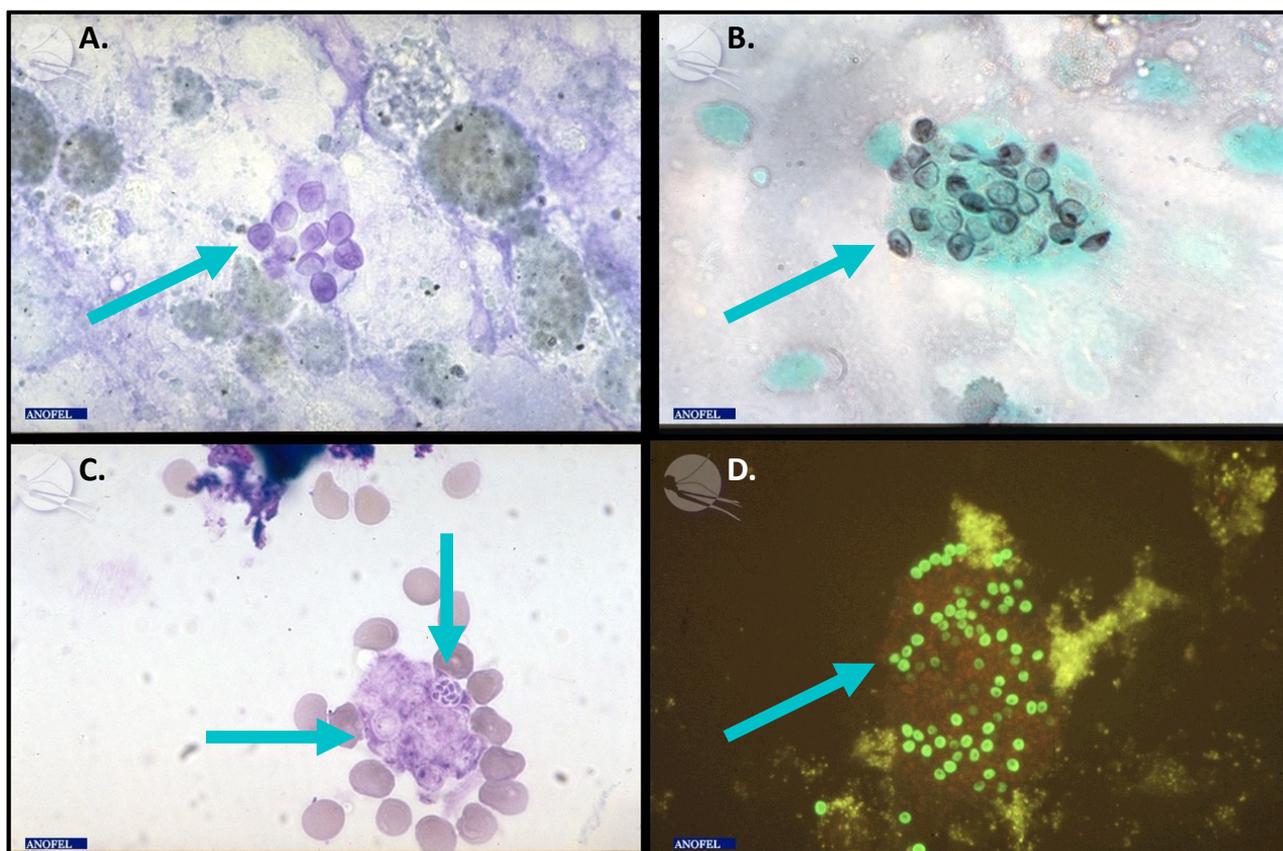


Figure 8 – Diagnostic microscopique de *Pneumocystis*. A. LBA coloré au bleu de Toluidine x500. Visualisation des asques (flèche). B. LBA coloré par imprégnation argentique de Gomori-Grocott x500. Visualisation des asques dont la paroi est colorée en noire (flèche). Les asques vides apparaissent tels des ballons dégonflés. C. LBA coloré au May-Grunwald Giemsa x500. Visualisation d'un amas spumeux contenant des asques (flèche horizontale). Un de ces asques mature contient 8 ascospores (flèche verticale). D. Image d'immunofluorescence indirecte avec un anticorps marqué à la fluorescéine. Visualisation des asques en vert (flèche bleue). Images : *eanofel.fr*

La charge fongique étant significativement inférieure chez les patients VIH négatifs, la sensibilité diagnostique des techniques de microscopie citées est faible dans cette population de patients. De plus, ces techniques requièrent une expertise au microscope.

II. C. d. 6. iii. Diagnostic moléculaire

La recherche de l'ADN de *Pneumocystis* par PCR est aujourd'hui la méthode de choix pour détecter de façon sensible et spécifique le champignon et poser le diagnostic de PCP. Du fait du caractère non cultivable de *Pneumocystis*, le séquençage du génome complet a été réalisé tardivement (56,57) retardant l'annotation de potentielles cibles. Plusieurs cibles sont actuellement utilisées pour le diagnostic moléculaire : des gènes simples copies comme *dhfr*, *dhps*, *kex1* ou *hsp70* ou des gènes existant en plusieurs copie comme *msg* ou bien des gènes mitochondriaux tels que *mtLSU rRNA*, *mtSSU rRNA*, *nad1* ou *cytb* (58,59). De façon

exceptionnelle, des mutations sur ces cibles ont été décrites dans la littérature comme pouvant conduire à des faux négatifs. Par exemple, dans une étude multicentrique de Le Gal *et al.* (60), une mutation sur la zone d'accrochage de la sonde ciblant le gene *mtLSU rRNA* a été retrouvée dans 0,28% des isolats testés, conduisant à l'absence de détection moléculaire.

Les laboratoires de mycologie médicale ont recours soit à des techniques « maison » (58,61,62), soit à des kits commerciaux. La réaction de la polymérisation en chaîne (PCR) présente une excellente valeur prédictive négative (100% sur un LBA). Les systèmes de PCR quantitatives (qPCR) permettent d'avoir une évaluation de la charge fongique pulmonaire, ce qui est parfois utilisé pour orienter le clinicien entre une PCP ou une colonisation chez un patient. Toutefois, un seuil d'interprétation est ardu à définir, en partie en raison de la difficulté à standardiser le prélèvement respiratoire. En pratique, l'interprétation de la charge fongique pulmonaire pour distinguer une colonisation d'une PCP dépend de la technique utilisée dans un laboratoire donné, du type et de la qualité des échantillons mais aussi du statut VIH du patient (61).

Dans un cadre épidémiologique, le typage moléculaire des isolats cliniques de *Pneumocystis* retrouvés pourra être effectué à l'aide d'outils de séquençage. Ces techniques permettent de documenter l'origine des épidémies au sein d'un service clinique (36) ou bien de suivre chez un même patient l'évolution des souches dont il est porteur.

II. C. d. 6. iv. Dosage des β -D-Glucanes

Comme d'autres champignons, la paroi de *Pneumocystis* est riche en β -1,3D-Glucanes qu'il est possible de doser dans le sérum d'un patient avec une suspicion de PCP, à l'aide d'un kit commercial par exemple. Les β -1,3D-Glucanes sont des marqueurs dit « pan-fongiques » qui orientent vers une infection fongique. Chez les patients atteints de PCP, les taux de β -1,3D-glucanes sont généralement élevés (>500 pg/mL) (63) ce qui peut orienter vers une PCP sans toutefois se substituer aux techniques précédemment citées.

II. C. d. 7. Traitement et prophylaxie

Chez le patient atteint de PCP ou à risque de développer l'infection, les molécules actives sur *Pneumocystis* sont utilisées aussi bien en traitement curatif que prophylactique, la dose prescrite étant différente suivant l'indication. La prophylaxie primaire est recommandée

chez les populations à risques. Le traitement curatif sera initié devant des arguments clinico-radiologiques et biologiques. La prophylaxie secondaire est recommandée suite à un épisode de PCP.

L'intérêt thérapeutique du cotrimoxazole (Bactrim®) contre *Pneumocystis* a été démontré (64) en 1977, avant le début de la pandémie de VIH. Depuis, elle est la molécule la plus utilisée, aussi bien en prophylaxie primaire et secondaire, qu'en traitement curatif chez tous les types de patients atteints ou à risque de PCP.

Le cotrimoxazole contient une association d'un sulfamide, le sulfaméthoxazole (SMX), ciblant la dihydroptéroate synthase (DHPS), et d'un antifolinique, le triméthoprime (TMP), ciblant la dihydrofolate réductase (DHFR). Ces deux molécules ont une action synergique aboutissant à la lyse de *Pneumocystis*. Le cotrimoxazole est disponible en formulations IV et *per os*.

En traitement curatif, le cotrimoxazole est utilisé pour une durée de 3 semaines en IV puis en relais *per os*. Des effets indésirables peuvent apparaître lors de la deuxième semaine de traitement et sont à type de fièvre, éruption, céphalée, nausée, vomissement, neutropénie, pancytopenie, méningite aseptique, néphrotoxicité, anaphylaxie, hépatite, hyperkaliémie et hypoglycémie. Il peut occasionner des anémies hémolytiques en cas de déficit en G6PD (47).

Les effets prophylactiques du cotrimoxazole ont été démontrés dans des essais cliniques (64). La dose classique est de un comprimé de Bactrim Forte® (800 mg/160 mg de TMP-SMX), 3 fois par semaine (29).

Il n'existe pas, à ce jour, de résistance clinique documentée au cotrimoxazole aux doses curatives bien que des mutations de DHPS soient fréquemment retrouvées (65). Toutefois, des échecs prophylactiques ont été décrits chez des patients VIH positifs porteurs de souches mutées (66).

En cas d'intolérance au Bactrim®, d'autres molécules peuvent être utilisées en seconde intention. Il s'agit de la pentamidine (Pentacarinat®), l'atovaquone (Wellvone®) et la dapsonne (Dilusone®). L'association clindamycine–primaquine peut aussi être utilisée.

En complément du traitement par cotrimoxazole, l'administration concomitante de corticostéroïdes (CTC) a fait ses preuves chez les patients VIH positifs atteints de PCP hypoxémiant (PaO₂ < 70 mmHg) (67). La maladie ayant une forte composante inflammatoire, les CTC permettent de diminuer rapidement la symptomatologie en limitant l'inflammation

pulmonaire. Chez les patients VIH négatifs, les données restent, à ce jour, contradictoires concernant l'utilisation adjuvante des CTC.

La prise en charge médicamenteuse d'un sujet colonisé à *Pneumocystis* présentant des facteurs de risques fait également débat. Dans la mesure où le portage de *Pneumocystis* favorise un environnement pro-inflammatoire, le traitement anti-*Pneumocystis* doit être discuté pour un patient ayant un terrain à risque.

II. D. Réponse immune contre *Pneumocystis*

Pour clôturer la partie introductive de ce mémoire, nous allons établir une revue de la littérature concernant les connaissances sur la réponse immune contre *Pneumocystis* chez un hôte immunocompétent.

II. D. a. Modèles d'études de *Pneumocystis*

A ce jour, il n'existe pas de modèle *in vitro* de culture pour *Pneumocystis* spp. Par conséquent, les connaissances actuelles sur le champignon ou la physiopathologie de la maladie restent limitées.

II. D. a. 1. Études chez l'Homme

Les études chez l'Homme permettent d'étudier le pathogène en conditions réelles mais sont limitées en termes de prélèvement chez l'hôte (sang et LBA principalement) et les conditions étudiées sont restreintes. Il s'agit d'études de cohorte de patients ayant fait des PCP (55,68,69) présentant des facteurs de risques comme la prise d'un traitement déplaçant une population particulière de leucocytes (70–72) ou encore des patients ayant des déficits immunitaires congénitaux.

II. D. a. 2. Études sur modèles animaux

Les modèles animaux sont très utilisés dans l'étude de *Pneumocystis*. Ils permettent i) d'étudier le cycle du champignon, ii) d'étudier la physiopathologie des réponses immunes, iii) de servir de modèle pré-clinique. Depuis les années 2000, la majorité des travaux publiés concernent l'étude de la physiopathologie de l'infection à *Pneumocystis* (73).

Les études chez l'animal reposent essentiellement sur les **modèles murins** (96% des études (73)) et en particulier l'infection par *P. murina* chez la souris. En cas de déficit de l'immunité, la souris infectée présente une atteinte pulmonaire mimant la PCP observée chez l'Homme (74). Le modèle murin permet d'étudier la maladie en condition contrôlée et de moduler qualitativement et quantitativement les différents acteurs de l'immunité.

Ces modèles nécessitent une **immunodépression préalable** de la souris, induite soit par des anticorps anti-CD4 mimant l'immunité d'un patient porteur du VIH, soit par CTC mimant une immunodépression plus globale, soit constitutive *via* des phénotypes knock-out. A l'heure actuelle, l'essentiel des patients présentant une PCP sont négatifs pour le VIH mais 75 à 80% d'entre eux ont été traités par corticothérapie (50). Les modèles murins utilisant des CTC sont donc à plébisciter dans le contexte épidémiologique actuel.

II. D. a. 3. Mode d'infection des animaux

L'infection des souris peut se dérouler de deux façons selon les études.

Une transmission **passive** appelée « **co-housing** » met à profit la transmission aérienne inter-individuelle du champignon. Il consiste à héberger dans une même cage un hôte immunodéprimé (par modification génétique et/ou avec un traitement médicamenteux) et infecté par *Pneumocystis* avec des individus sains qui se contamineront au bout de quelques jours ou semaines (75). Cette méthode d'infection mime l'acquisition naturelle du champignon chez l'Homme mais ne permet de maîtriser ni la dose, ni le moment de l'infection, entraînant ainsi un risque d'inhomogénéité entre les animaux.

La transmission active par **inoculation directe** de *Pneumocystis* après anesthésie est également pratiquée. Elle peut se faire par différentes voies. La voie intratrachéale consiste à inciser la trachée et déposer *via* une canule la suspension de champignon calibrée avant de refermer. C'est la voie d'infection la plus souvent retrouvée dans les publications (73). L'instillation intra-nasale est la méthode d'infection la plus facile à réaliser et la moins invasive pour l'animal. En effet, après anesthésie, la souris inhale spontanément la suspension calibrée de *P. murina*. Cette voie est peu traumatique pour l'animal, la quantité instillée est bien maîtrisée si l'animal inhale bien toute la suspension. L'inoculation directe par l'expérimentateur permet de maîtriser l'inoculum et le moment de l'infection. Cependant, l'inoculum instillé est souvent supérieur à la dose physiologiquement infectante et peut contenir des impuretés liées au mode de production des asques à partir d'homogénats de poumons infectés. *A contrario*, certains auteurs ont recours à une double inoculation directe à une

semaine d'écart afin de s'assurer d'un dépôt adéquat de *Pneumocystis* dans le tractus respiratoire inférieur (76).

II. D. a. 4. Difficultés d'interprétation des modèles murins

La multiplicité des modèles animaux décrits dans la littérature peut conduire à des difficultés d'interprétation des résultats. La variabilité est notamment due à i) l'hôte utilisé et sa génétique, ii) la méthode d'induction de l'immunodépression, iii) le mode d'infection de l'animal (73).

Des modèles avec des **fonds génétiques** différents sont retrouvés dans les études. Concernant les infections à *P. murina*, les souris utilisées sont principalement des Balb/c (à immunité T_H2 prédominante) ainsi que des C57BL/6 (à prédominante T_H1). Dans l'étude de Swain *et al.* (77), les charges fongiques et les leucocytes dans le LBA de souris Balb/c et C57BL/6 infectées de la même manière présentaient des cinétiques différentes : les Balb/c présentaient un recrutement précoce de T CD4, NK et PNN non retrouvé chez les C57BL/6 malgré une clairance du champignon dans les deux groupes. Le champignon n'était plus visible en microscopie dès 14 jours d'infection pour les souris C57BL/6 contre 21 jours pour les Balb/c. Dans l'étude de An *et al.* (75), après infection par co-housing, les souris Balb/c présentaient un pic de charge fongique à 5 semaines d'infection puis se négatifaient à 6 semaines tandis que les souris C57BL/6 avaient une charge quasi négative en microscopie dès 4 semaines puis négative à 5 et 6 semaines d'infection, en dépit d'un taux d'IgG similaire entre les deux types de fond génétiques. Une élimination plus rapide du champignon semble survenir chez les souris C57BL/6.

Les réponses immunitaires sont également variables suivant le **sexe** de l'animal. Les études sont plus volontiers menées chez des souris femelles plus sensibles au champignon que les mâles (78).

La méthode **d'induction de l'immunodépression** de l'hôte (CTC, anticorps déplétant une population cellulaire, souris knock-out) nécessaire au développement d'une PCP peut induire une certaine variabilité. Toutefois, ces modèles présentent la limite de ne pas tenir compte du caractère redondant de la réponse immune. Des mécanismes compensatoires peuvent ainsi se mettre en place chez ces animaux, faussant l'interprétation de l'évolution de l'infection.

L'**inoculum injecté** peut aussi être la source de variabilité inter-modèles. Alors que les souris Balb/c immunocompétentes qui recevaient 10^6 asques par voie intra-trachéale dans

l'étude de Rong *et al.* (79), voyaient leur quantité de LB diminuer à 2 semaines d'infection, les LB augmentaient suite à une même infection avec 10^7 noyaux dans l'étude de Swain *et al.* (80).

Enfin, contrairement aux patients humains immunodéprimés, développant une PCP et non immunologiquement naïfs vis-à-vis du pathogène *Pneumocystis*, la plupart des modèles murins utilisent des animaux naïfs, notamment afin de limiter le temps nécessaire aux expérimentations (6 semaines au lieu de 12).

Tous ces facteurs de variabilités doivent être envisagés dans l'interprétation des phénomènes observés, car ils peuvent modifier le déroulement de l'infection et donc, les conclusions de l'expérimentation. Lorsque c'est possible, l'idéal est de comparer des réponses au sein d'un même modèle, c'est-à-dire même fond génétique, même voie et dose inoculée, même hébergement, etc.

II. D. b. La réponse immune chez un hôte immunocompétent

La réponse immune de l'hôte contre *Pneumocystis* est essentielle dans le contrôle du champignon. Cette réponse est variable suivant le statut immunitaire de l'hôte (81). Chez un individu immunocompétent, le champignon est rapidement éliminé de l'environnement alvéolaire sans symptôme. L'essentiel des données existantes sur les réponses immunes de l'immunocompétent sont issues d'études sur modèles murins et ont été générées à partir de modèles de primo-infection.

II. D. b. 1.Reconnaissance

Suite à l'entrée de *Pneumocystis* dans les voies respiratoires, le champignon est reconnu grâce à ses motifs de paroi. Les Major Surface Glycoprotein (MSG) et β -D-glucanes exprimés à la surface des asques jouent le rôle de motifs de danger et sont reconnus par les TLR des cellules du tractus respiratoire. Cela conduit à l'activation des cellules et la production de diverses cytokines et chimiokines permettant l'afflux des cellules de l'immunité. En particulier, la liaison pathogène-TLR conduit à l'expression de CCR7 par les DC permettant leur migration vers les ganglions et l'activation de l'immunité adaptative.

II. D. b. 2.Afflux des cellules aux poumons

Après reconnaissance de *Pneumocystis*, diverses cellules immunitaires vont affluer depuis les ganglions lymphatiques vers les alvéoles pulmonaires. Un fort infiltrat inflammatoire est observé à 2-3 semaines d'infection dans les modèles Balb/c développés par Swain et Shellito

qui disparaîtra concomitamment à la négativation de la charge fongiques (80,82). Ces cinétiques sont reprises dans la **Figure 9**.

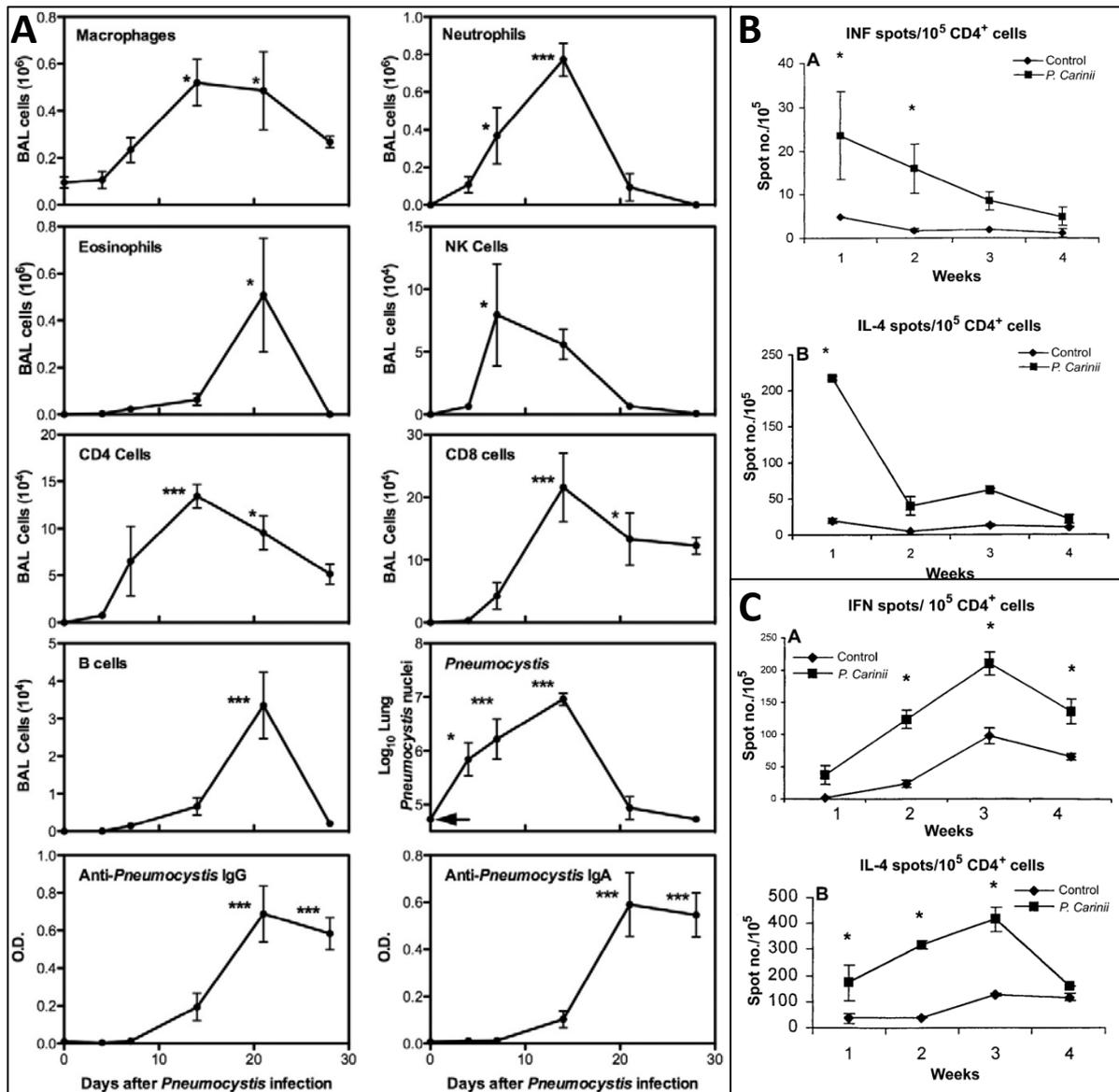


Figure 9 – Cinétiques de réponse lors de l'infection à *P. murina* dans des modèles immunocompétents Balb/c. A. Graphiques tirés de Swain *et al.* (80) suite à une infection intratrachéale. Quantifications leucocytaires effectuées dans le LBA par cytométrie en flux. Les lymphocytes NK et les PNN sont les premières cellules à croître dans le LBA, suivies par les T CD4 et T CD8 puis les B, PNE et les macrophages alvéolaires qui augmentent graduellement. Les IgG et IgA anti-Pneumocystis apparaissent entre 14 et 21 jours après infection en corrélation avec la clairance de Pneumocystis. B et C. Graphiques tirés de Shellito *et al.* (82) suite à une infection intratrachéale. Quantification en Elispot des populations T_{H1} (IFN CD4+) et T_{H2} (IL-4 CD4+) dans les ganglions lymphatiques (B) et dans le tissu pulmonaire (C). Les lymphocytes T_{H1} et T_{H2} apparaissent à partir de 3 semaines d'infection puis diminuent.

II. D. b. 3. Réponse T

Suite à l'infection par *Pneumocystis*, les souris immunocompétentes présentent une augmentation des **lymphocytes T CD4**. Ils tiennent un rôle pivot avec le recrutement et l'activation des cellules, la production de cytokines, la mémoire immunitaire (83), et sont nécessaires à la résolution de l'infection. En effet, un taux de lymphocytes T CD4 $<200/\text{mm}^3$ constitue un facteur de risque majeur de PCP, notamment chez les patients VIH positifs (69). Leur rôle est confirmé sur modèle murin lorsqu'on déplete spécifiquement la population T CD4, le champignon persiste (76,84).

Les quatre **sous-populations de T CD4** (T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} et Treg) sont souvent augmentées au cours de la réponse contre *Pneumocystis*. Il semble y avoir un profil T_{H2} prépondérant dans les réponses à l'infection (82). Toutefois, la déplétion spécifique des sous-populations T CD4 retarde l'élimination du champignon mais n'entraîne pas de PCP, augurant un rôle non majeur dans la protection contre *Pneumocystis* (74,85). De plus, le rôle de chacune d'entre elles n'est pas clairement établi (participation à la résolution de l'infection et/ou aux mécanismes lésionnels). En revanche, les T CD4 participent aussi aux mécanismes lésionnels (86).

Les **lymphocytes T CD8** tiennent une place controversée et semblent peu impliqués dans la réponse immune chez l'immunocompétent (42) bien que ces cellules soit augmentées suite à l'infection (80). Dans l'étude de Beck *et al.* (87), en absence de T CD4, les souris Balb/c développent une PCP d'intensité modérée à 4 semaines d'inoculation alors que la déplétion en lymphocytes T CD8 n'entraîne pas de PCP. La déplétion des T CD4 et CD8 entraîne une PCP associée à une charge fongique élevée. Cela suggère un rôle minoritaire des T CD8 dans la réponse immune contre *Pneumocystis*.

II. D. b. 4. Réponse B

Les **lymphocytes B** et la **réponse humorale** dirigés contre *Pneumocystis* interviennent également dans l'immunité contre ce champignon. Les études chez la souris déplétée en lymphocyte B (88–90) ou chez l'Homme par la survenue de PCP en cas de traitement par anti-CD20 (70,72) en témoignent. Dans les modèles de Swain et Beck, les LB augmentent 2 semaines après l'inoculation par *Pneumocystis* (80,84) alors que les anticorps apparaissent vers 3 semaines et perdurent. Les lymphocytes B sont essentiels à la génération de LT CD4+ effecteurs et mémoires capables d'éliminer *Pneumocystis* (89). L'effet protecteur des

lymphocytes B est préférentiellement lié à leur action d'activation ou d'expansion des cellules T CD4+ *via* le CD40 (91) et peu à la production d'anticorps spécifiques selon les travaux de Lund *et al.* (88).

II. D. b. 5. Coopération B et T

Les **iBALT** permettent, à l'instar des OL-II, une coordination entre lymphocytes T et B dans le tissu pulmonaire. Néanmoins, il n'existe que très peu de données concernant le rôle des iBALT au cours des infections à *Pneumocystis* : seule l'équipe d'Eddens *et al.* (14) a récemment montré la capacité de souris C57BL/6 immunocompétentes à induire la formation d'iBALT au contact de *Pneumocystis*. Les données préliminaires de l'équipe 6 Infinity rejoignent les observations d'Eddens (données non publiées). Dans le modèle d'Eddens, les cellules à signature T_H2 et T_H17 étaient requises au développement de ces iBALT.

II. D. b. 6. Élimination de *Pneumocystis*

Les **macrophages** jouent un rôle clé dans la clairance du champignon, favorisé par l'interféron- γ et les IgG spécifiques (42,83,92). Les macrophages polarisés M1 et M2 sont capables de lyser *Pneumocystis*. Cependant, l'orientation M2 conduit à une meilleure clairance et à une inflammation réduite par rapport aux M1 (93). Cette orientation M2 est retrouvée de façon prépondérante chez l'hôte immunocompétent.

Les **lymphocytes NK** et les **PNE** sont recrutés au cours de l'infection à *P. murina* chez l'immunocompétent (80), Kelly *et al.* ont montré leur implication dans les réponses immunes contre *Pneumocystis* (94).

Pour résumer cette partie, Charpentier *et al.* proposent ce schéma hypothétique des réponses immunes chez un hôte immunocompétent **Figure 10**.

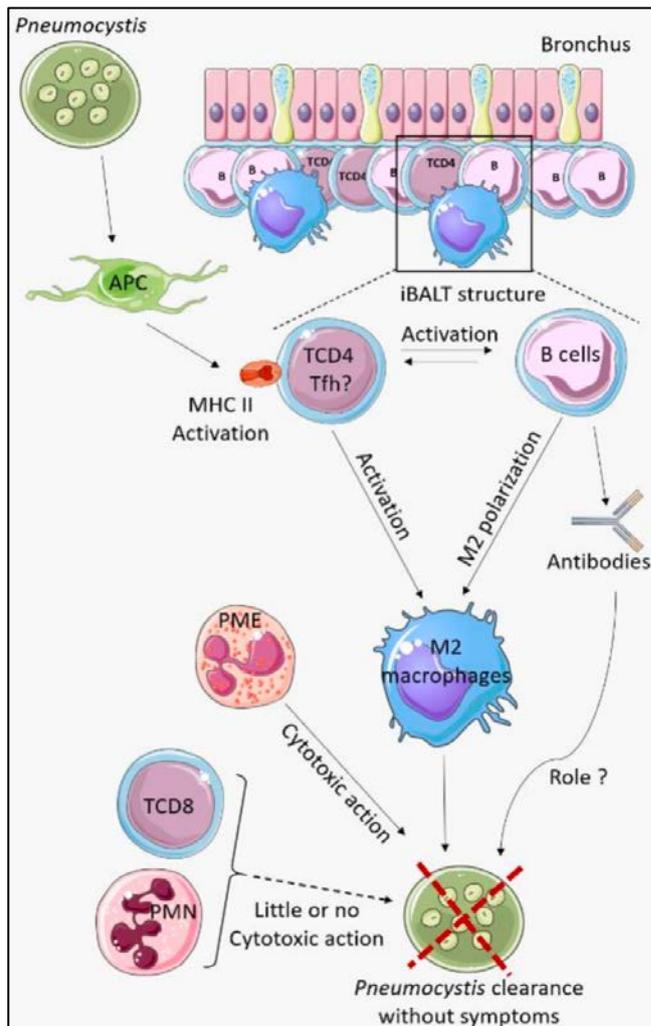


Figure 10 – Schéma hypothétique des réponses immunes de l'hôte immunocompétent suite à l'infection par *Pneumocystis*. D'après Charpentier *et al.* (81) PMN : Polymorphonuclear neutrophil (PNN). PME : Polymorphonuclear eosinophil (PNE). APC : Antigen presenting cell (CPA). *Pneumocystis* est reconnu par une CPA qui initie les réponses T CD4 et B, ces deux populations lymphocytaires pourraient être réunies au sein de structure iBALT (un centre germinatif entouré de T_{FH}). L'action jointe des B et T CD4 active les macrophages, plutôt de type M2 chez l'immunocompétent, principales cellules impliquées dans l'élimination du champignon. Tandis que les T CD8 et les polynucléaires semblent peu impliqués. Cette réponse se déroule chez un hôte immunocompétent sans symptômes respiratoires.

II. D. c. Influence d'une primo-infection ou d'une réinfection sur la réponse immunitaire dirigée contre *Pneumocystis* sur les modèles murins de pneumocystose

Afin de faciliter les expérimentations, l'essentiel des données acquises sur la réponse immunitaire contre *Pneumocystis* a été généré à partir de modèle de primo-infection. Peu de travaux ont évalué l'influence d'une primo-infection suivi d'une seconde infection sur le modèle murin de PCP (72,85,92,95–97). Dans ces publications, seules les populations lymphocytaires principales (B, T CD4 et T CD8) ont été étudiées au cours de la réponse secondaire à *Pneumocystis*. Les sous-populations de T CD4 et T CD8, essentielles pour comprendre cette réponse, n'ont pas été caractérisées. Des stratégies approchant les modèles de réinfections ont été développées, basées sur l'administration préalable d'anticorps anti-*Pneumocystis* (98) ou d'antigènes (99). D'autre part, les réponses lymphocytaires mises en place dans un modèle de souris immunocompétentes sont pertinentes à explorer dans la mesure où il s'agit de l'interaction hôte-champignon la plus fréquente, préalable à une éventuelle PCP.

III. Objectifs de l'étude

Malgré un traitement adapté, la mortalité de la PCP reste de 20 à 30%. La population à risque étant grandissante du fait d'un recours aux traitements immunosuppresseurs de plus en plus important, la gestion de la PCP représente un enjeu de santé publique majeur. La compréhension des mécanismes physiopathologiques de la PCP est essentielle pour mieux prévenir l'infection et développer de nouvelles approches thérapeutiques ou vaccinales. Cependant, les connaissances sur sa physiopathologie restent parcellaires, notamment les mécanismes immunitaires impliqués dans la réponse contre *Pneumocystis*. Les études chez l'Homme sont difficiles à mener et restent limitées en termes de mécanistique. En l'absence de modèle *in vitro* de *Pneumocystis* spp., les modèles murins sont la meilleure alternative pour répondre à ces questions. Il est donc primordial de caractériser ces modèles pour connaître les similarités et les différences par rapport à l'infection chez l'Homme, et pouvoir les utiliser comme modèles pré-cliniques pertinents.

Nous émettons l'hypothèse que la réponse immunitaire, notamment lymphocytaire, sera différente suivant qu'il s'agisse d'une primo-infection ou bien d'un deuxième contact avec le champignon. Étudier ces réponses primaires et secondaires nous permettra de mieux caractériser les réponses de l'hôte vis-à-vis du *Pneumocystis* lors d'un deuxième contact. Ce modèle d'infection après préexposition serait plus en adéquation avec ce qui se passe en réalité chez l'Homme.

Pour confirmer cette hypothèse, nous allons caractériser et comparer les réponses immunes lymphocytaires chez des souris immunocompétentes après un premier ou un deuxième contact avec *Pneumocystis murina*.

En effet, nous pensons que le modèle d'infection unique présente des limites par rapport à ce qui est observé au cours de la PCP humaine. Le modèle de contact préalable à la deuxième exposition devrait se rapprocher de la physiopathologie de l'infection et pourrait être plus en adéquation avec les données dont nous disposons chez l'Homme. Ce modèle murin incluant une préexposition avec *Pneumocystis* pourrait donc être plus pertinent pour les études futures.

A une plus large échelle, une meilleure connaissance des interactions hôte-pathogène dans la PCP pourrait permettre d'optimiser la prise en charge de la maladie chez l'Homme : amélioration de la prévention et développement de nouvelles approches thérapeutiques ou vaccinales.

IV. Matériels et Méthodes

IV. A. Souris utilisées

La souche de *Pneumocystis murina* utilisée est produite à partir de souris SCID (Charles River).

Pour ce projet, des souris femelles Balb/c Specific Pathogen Free (Charles River) ont été utilisées. Elles ont toutes bénéficié d'une semaine d'acclimatation avant le début des expérimentations et avaient 16 semaines au moment de l'infection à la semaine 0 (S0) (**Figure 11**). Les animaux ont été hébergés en animalerie type A2 au "Centre Régional d'Exploration Fonctionnelle et de Ressources Expérimentales" (CREFRE-Inserm UMS006). Réparties dans des cages de 5 maximum, avec filtration d'air, les souris disposaient d'eau et de nourriture à volonté. Les souris ont été manipulées sous hotte à flux laminaire.

IV. B. Infection des souris

Le modèle murin d'infection à *P. murina* utilisé a été mis en place au sein de l'équipe 6 Infinity (Institut Toulousain des Maladies Infectieuses et Inflammatoires) lors de précédents travaux. Chaque stock de *P. murina* est préparé et testé dans l'équipe puis conservé dans l'azote liquide au laboratoire.

Pour les infections, chaque souris, après anesthésie volatile à l'isoflurane (4%), a reçu par voie intranasale 10^6 asques de *Pneumocystis murina* (20 μ L de suspension fongique). Les souris naïves ont reçu 20 μ L de broyats de poumons sains issu de souris SCID.

IV. C. Protocole expérimental

Les protocoles de soins et d'utilisation des animaux ont été approuvés par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale (APAFIS #18339).

IV. D. Évaluation de la charge fongique

La quantification de la charge fongique pulmonaire a été réalisée par PCR quantitative (qPCR) spécifique de *P. murina*. La charge fongique en *P. murina* a été déterminée sur une prise d'essai calibrée de 25µL, correspondant au surnageant de broyats de poumon exprimés dans du RPMI. L'extraction d'ADN a été réalisée avec le kit DNeasy Blood & Tissue Kits (Qiagen) d'après le protocole du fournisseur. Une PCR quantitative a été effectuée en utilisant les amorces vhw5a (5-TTCCGGCCTCTTAAAGGTCG-3) et vhw3a (5-CTAGGATGTTCCATAGCCGC-3) et les sondes FRET MDHFR1 (5-AGACAAGGAATACATTGTGCAAGAT-fluorescein-3) et MDHFR2 (5-LC Red 640-TGGATGATGCTTTAGAACTTCT-phosphate-3) (100). Après activation de la Taq polymérase, 15 minutes à 95°C, 3 étapes d'amplifications différentes se sont succédées : les 5 premiers cycles comportaient une dénaturation de 15 secondes à 95°C, une hybridation de 10 secondes à 65°C puis une élongation de 10 secondes à 72°C alors que les 5 cycles suivants comportaient une étape d'hybridation de 10 secondes à 60°C et les 35 derniers cycles de 10 secondes à 55°C. La qPCR a été réalisée sur LightCycler480 (Roche). Les résultats ont été exprimés sous forme de quantification relative de la charge fongique avec la valeur 35-Ct.

IV. E. Histopathologie des poumons

Après exsanguination sous anesthésie générale (isoflurane), les poumons ont été prélevés et fixés par instillation intra-trachéale de formol. Les tissus ont été conservés 24h dans le formol avant d'être transférés dans l'éthanol 70% à 4°C jusqu'à l'inclusion. Le traitement des organes et des lames a ensuite été réalisé par le plateau d'histologie du centre Infinity, jusqu'à la numérisation. Après inclusion en bloc de paraffine, des coupes histologiques de 5µm ont été réalisées au microtome Leica RM2245 (Leica) puis colorées en hématoxyline-éosine (HE) pour apprécier les infiltrats cellulaires. Un marquage des lymphocytes B et T a été réalisé en immuno-histochimie par des anticorps de rat anti-B220 (Biorad) et de lapin anti-CD3 (Abcam), respectivement. Toutes les coupes ont été numérisées avec un scanner de lame Panoramic 250 Flash III slide (3D Histech) au grossissement x400. Les cellules ainsi que les amas cellulaires (iBALT) ont ensuite été dénombrés à l'aide du logiciel QuPath (<https://qupath.github.io>).

IV. F. Étude des réponses lymphocytaires par cytométrie en flux

Après exsanguination et sacrifice des souris, les poumons et les rates ont été collectées dans du milieu RPMI complet (supplémenté à 10% SVF, 1% Pénicilline/streptomycine, 1% Sodium pyruvate, 0,1% β -Mercaptoéthanol). Les poumons ont été émincés au scalpel puis une digestion enzymatique (DNase I 0,1 mg/mL et collagénase IV 0,1 mg/mL) en RPMI complet sans sérum a été réalisée pendant 30 min à 37°C, avant de passer le broyat sur un tamis de 100 μ m. Les cellules ont été lavées en RPMI complet puis mises en suspension dans du Percoll 60% (RPMI complet) séparé avec du Percoll 30% (PBS). Après 20 minutes de centrifugation à 1600g, les cellules mononuclées ont été récupérées. Une lyse des globules rouges a été réalisée par un tampon de chlorure d'ammonium (EDTA 100 μ mol/L, 160nmol/L NH_4Cl , 10 mmol/L NaHCO_3). Les rates ont été filtrées sur tamis de 100 μ m puis les globules rouges ont été lysés selon le même protocole que les poumons. La quantité de cellules en suspensions a été évaluée sur cellules de Malassez. Deux panels d'anticorps ont été utilisés afin de caractériser les différentes populations lymphocytaires pulmonaires et spléniques : un panel permettant de caractériser les sous-populations lymphocytaires après stimulation des cellules pulmonaires (annexe 1) et un panel avec stimulation des splénocytes (annexe 2). Pour ces deux panels, 10⁶ cellules ont été stimulées pendant 4h15 à 37°C avec de l'acétate de phorbol myristique (PMA) à 0,5 μ g/mL et de la ionomycine (2 μ g/mL). La Brefeldine A (0,1%) a été ajoutée pour bloquer l'excrétion des cytokines en vue de leur marquage. Les anticorps utilisés et les dilutions appliquées pour chaque panel sont détaillés dans les annexes 1 et 2. Les marquages ont été réalisés en 3 étapes : i) après saturation des récepteurs Fc (FcR block, anti-CD16/anti-CD32), les cellules ont été marquées avec le viability Dye (marquant les cellules mortes) ; ii) les cellules ont ensuite été marquées avec les anticorps extracellulaires. Les marquages intracellulaires ont été effectués après fixation et perméabilisation ; iii) enfin les cellules ont été fixées en paraformaldéhyde (PFA) 1% avant l'acquisition au cytomètre en flux LSR Fortessa III (BD Biosciences). L'ensemble des données de cytométrie ont été analysées avec le logiciel FlowJo (version 10, BD Biosciences) selon les stratégies de gating présentées en annexe.

IV. G. Analyse statistique

Des tests non paramétriques de Mann-Whitney ont été utilisés pour comparer les résultats des pourcentages obtenus pour les différentes populations lymphocytaires, les valeurs

de 35-Ct de PCR et les dénombrements sur lames d'histologie. Les tests statistiques et les représentations graphiques ont été effectuées sur le logiciel GraphPad Prism version 5.0 (GraphPad). Les différences ont été considérées significatives pour une valeur de $P < 0.05$.

V. Résultats

V.A. Les souris pré-exposées à *Pneumocystis* ont une charge fongique indétectable par rapport aux souris primo-infectées

La quantification de la charge fongique a été réalisée par qPCR afin de suivre la cinétique d'infection les animaux.

Cette quantification a montré que les souris du groupe « pré-exposé » avaient bien été primo-infectées avec une charge détectable à S-5 (3 semaines de l'infection, données non représentées) mais avaient éliminé le champignon (charges négatives à S0) avant le 2^{ème} contact.

Avant l'inoculation à S0, aucun portage de *P. murina* n'a été mis en évidence par PCR pour les souris des groupes « primo-infecté » et « naïf » (**Figure 12**).

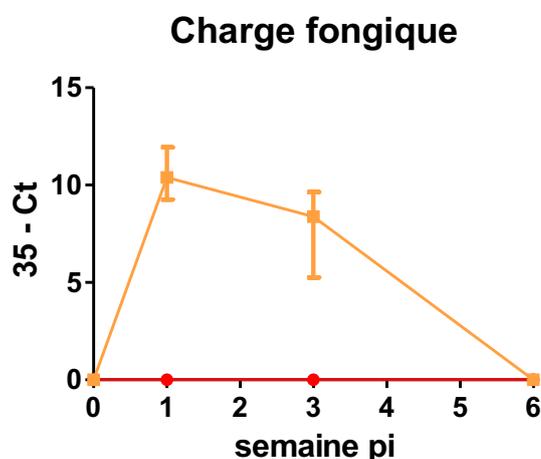


Figure 12 - Cinétique de la charge fongique au cours de la cinétique. Les points représentent les médianes des valeurs 35-Ct obtenues pour chaque groupe à chaque point de cinétique et la barre l'interquartile (25%-75%). Effectif par point : groupe « pré-exposé » en rouge n=8, groupe « primo-infecté » en orange n=8. pi : post inoculation intranasale.

Suite à l'infection à *P. murina* à S0, les 2 groupes d'intérêt montraient des cinétiques d'évolution de charge fongique différentes (**Figure 12**) : alors que les souris du groupe « primo-infecté » présentaient une charge maximale à S1, maintenue à S3 puis une élimination du champignon à S6 (excepté une souris), le groupe « pré-exposé » ne présentait aucune charge détectable durant toute l'étude. Le champignon restait indétectable pour les souris naïves avec le système de qPCR utilisé.

V. B. Les souris pré-exposées à *Pneumocystis* présentent des cinétiques de réponses lymphocytaires plus précoces par rapport aux souris primo-infectées

Afin de caractériser les réponses lymphocytaires chez les souris primo-infectées et les souris pré-exposées à *Pneumocystis*, une approche exploratoire des cinétiques de populations lymphocytaires pulmonaires par immunophénotypage a été mise en œuvre.

Le pourcentage global de leucocytes (CD45+) est resté stable au cours de l'infection quel que soit le groupe (données non représentées).

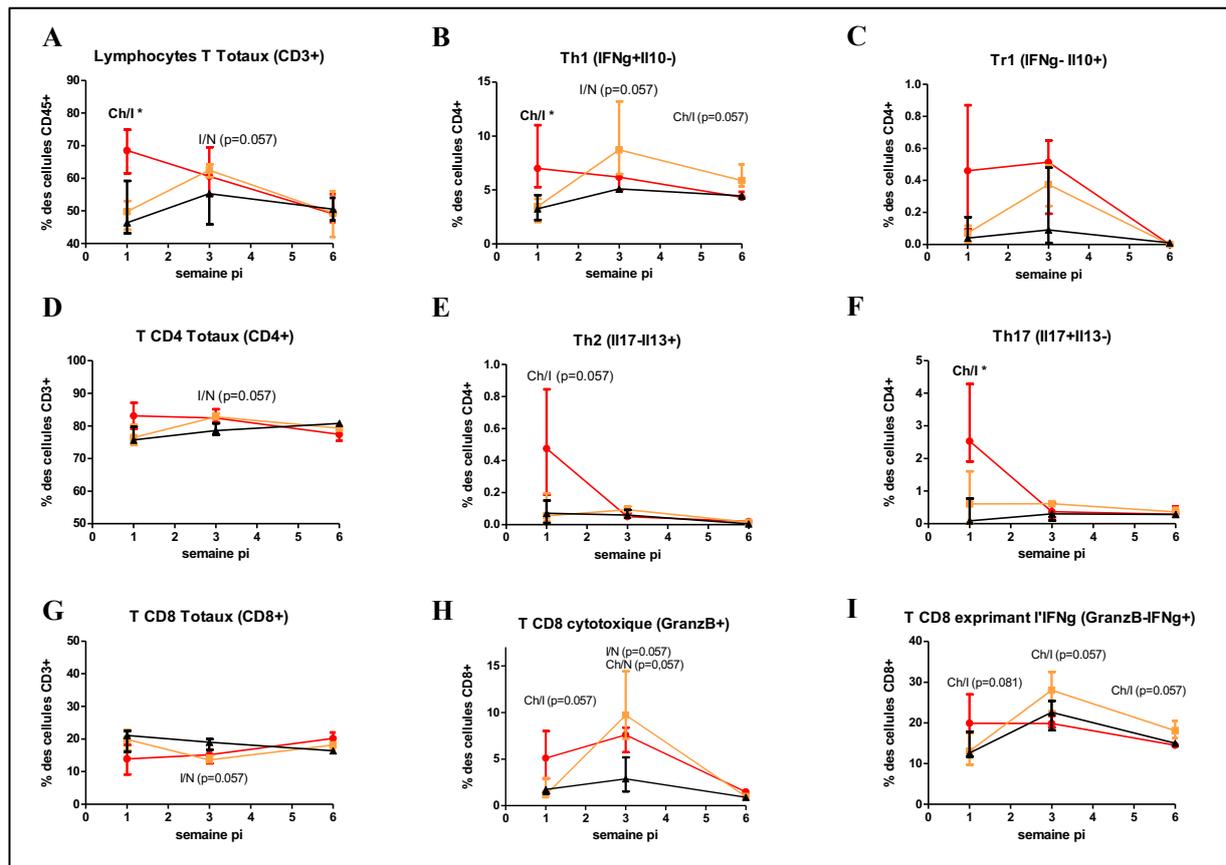


Figure 13 - Cinétique des sous populations effectrices lymphocytaires T CD4 et CD8 pulmonaires en réponse à l'infection par *P. murina*. Résultats obtenus à partir des cellules pulmonaires de souris stimulées par la PMA/ionomycine. Les points représentent les médianes obtenues pour chaque groupe à chaque point de cinétique et la barre l'interquartile (25%-75%). Effectif par point : groupe « pré-exposé » en rouge n=4, groupe « primo-infecté » en orange n=4, groupe « naïf » en noir n=3. Ch/N : comparaison statistique entre les groupes « pré-exposé » et « naïf », I/N : comparaison statistique entre les groupes « primo-infecté » et « naïf », Ch/I : comparaison statistique entre les groupes « pré-exposé » et « primo-infecté », * : P < 0,05.

Comparativement aux souris naïves, les souris primo-infectées ont présenté un profil d'augmentation tendanciel de plusieurs populations cellulaires à S3 de l'infection : augmentation du pourcentage des lymphocyte T totaux (**Figure 13A**), des T_H1 (exprimant l'interféron-γ, **Figure 13B**), des T CD8 cytotoxiques (exprimant la granzyme B, **Figure 13H**).

Seuls les pourcentages de T_H1 et T CD8 activés persistaient à S6 supérieurs aux souris pré-exposées (**Figure 13H, 13I**), les autres populations se normalisaient.

Le pourcentage de T CD8 activés (exprimant l'interféron- γ , **Figure 13I**) des souris primo-infectées était supérieur à celui des souris pré-exposées à S3.

Par rapport aux souris primo-infectées, les souris pré-exposées ont présenté une augmentation plus précoce (S1) de la plupart des populations cellulaires étudiées. Une augmentation significative du pourcentage de lymphocytes T totaux (**Figure 13A**), T_H1 (**Figure 13B**), T_H17 (exprimant l'Il-17, **Figure 13F**) a été observée. Une tendance à la hausse des pourcentages des T CD4 totaux (**Figure 13D**), T_H2 (exprimant l'Il-13, **Figure 13E**), des T CD8 cytotoxiques (**Figure 13H**, par rapport au souris naïves) et des T CD8 activés (**Figure 13I**) était constatée. Une tendance à la baisse des T CD8 totaux a également été observé à S1 (**Figure 13G**). La population des T CD8 cytotoxiques se maintenait à S3 puis se normalisait à S6. Les autres populations se normalisaient dès S3. Malgré des médianes plus élevées pour les lymphocytes ayant un profil T_R1 (exprimant l'Il-10, **Figure 13C**) à S1 et/ou S3 dans les groupes primo-infectées et pré-exposées par rapport aux souris naïves, il n'a pas été mis en évidence de différences significatives ou de tendances nettes.

Ces résultats montrent que les deux groupes d'intérêts (« primo-infecté » et « pré-exposé ») ont répondu différemment à l'infection par *P. murina*. Il semble que les souris pré-exposées mettent en place une réaction plus précoce et de nature différente par rapport aux souris primo-infectées.

V. C. Les souris pré-exposées à *Pneumocystis* ont acquis une mémoire immunitaire suite à leur premier contact

En travaillant sur l'influence de la primo-infection sur la réponse immune au cours d'une seconde infection, la caractérisation des cellules mémoires semblait indispensable. Les lymphocytes mémoires se répartissent en i) T centro-mémoire (T_{CM} exprimant KLRG1-CD127+) ; ii) T effecteur-mémoire (T_{EM} : KLRG1+ CD127+) et iii) T résident-mémoire (T_{RM} : CD69+ et/ou CD103+).

Au cours de cette expérimentation, des cellules mémoires ont été détectées uniquement chez les souris pré-exposées à *P. murina* au cours de la première semaine d'infection (S1) (**Figure 14**).

Dans les poumons, aussi bien pour les lymphocytes T CD4 (**Figure 14A**) que pour les T CD8 (**Figure 14B**), les proportions de T_{RM} doubles positifs CD103 et CD69 tendaient vers une augmentation à S1 et se normalisaient à S3.

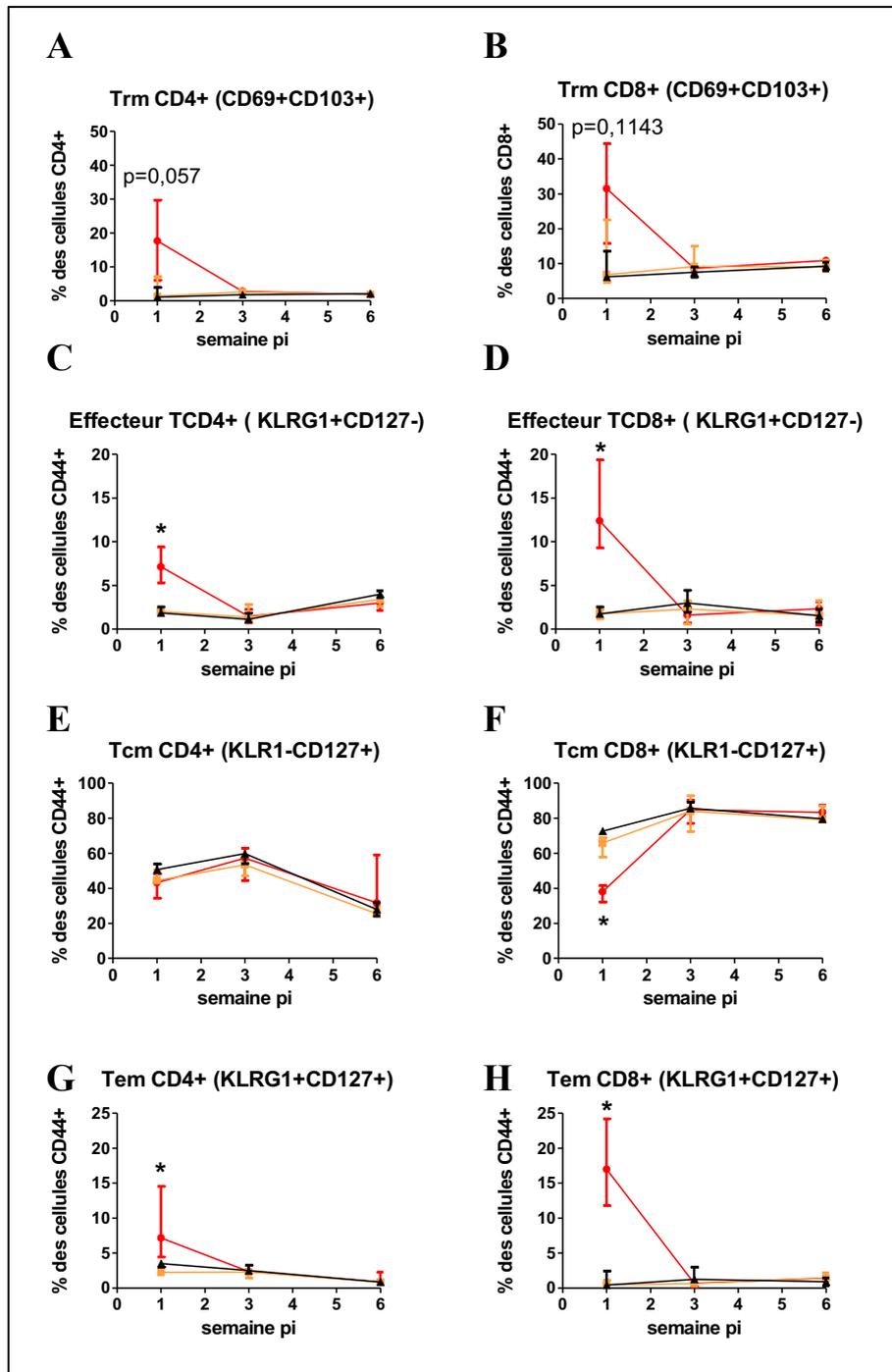


Figure 14 - Cinétique des cellules mémoires en réponse à l'infection par *P. murina*. A et B. Pourcentages de T_{RM} pulmonaires parmi les T CD4 et les T CD8 respectivement. C et D. Pourcentages de T effecteurs spléniques parmi les T CD4 et les T CD8 activés respectivement. E et F. Pourcentages de T_{CM} spléniques parmi les T CD4 et les T CD8 activés respectivement. G et H. Pourcentages de T_{EM} spléniques parmi les T CD4 et les T CD8 activés respectivement. Résultats obtenus à partir des cellules pulmonaires (A et B) et des splénocytes (C – H) stimulés par la PMA/ionomycine. Les points représentent les médianes obtenues pour chaque groupe à chaque point de cinétique et la barre l'interquartile (25%-75%). Effectif par point : groupe « pré-exposé » en rouge n=4, groupe « primo-infecté » en orange n=4, groupe « naïf » en noir n=3. Comparaisons statistiques réalisées entre les groupes « pré-exposé » et « primo-infecté », * : P <0,05.

L'immunophénotypage des lymphocytes issus de la rate, stimulés par la PMA/ionomycine a permis de caractériser le compartiment lymphoïde périphérique des souris dont les T_{CM} et T_{EM}. Parmi les T CD4, les cellules T effectrices (**Figure 14C**) et les T_{EM} (**Figure 14G**) étaient significativement augmentés à S1, alors que les T_{CM} ne variaient pas au cours du temps (**Figure 14E**). Parmi les T CD8, les T effecteurs (**Figure 14D**) et les T_{EM} (**Figure 14H**) étaient significativement augmentés à S1, tandis que les T_{CM} (**Figure 14F**) étaient significativement diminués à S1.

Ces résultats sont en faveur d'un recrutement de cellules mémoires dans les organes lymphoïdes secondaires et d'une activation locale des cellules mémoires résidentes par *P. murina* au cours d'un second contact.

V. D. Les souris pré-exposées à *Pneumocystis* produisent des structures iBALT-like avec une cinétique différente des souris primo infectées.

Les coupes histologiques effectuées sur les poumons des souris primo-infectées et pré-exposées et colorés en HE ont montrés des infiltrats lymphocytaires délimités (follicules) situés en regard des bronches et des vaisseaux suite à l'infection par *P. murina* (**Figure 15A**). Sur les coupes successives, les immunomarquages révèlent que ces follicules étaient composés de lymphocytes B (B220+, **Figure 15B**) groupés évoquant un centre germinatif entourés de lymphocytes T (CD3+, **Figure 15C**). Ces structures sont évocatrices d'iBALT.

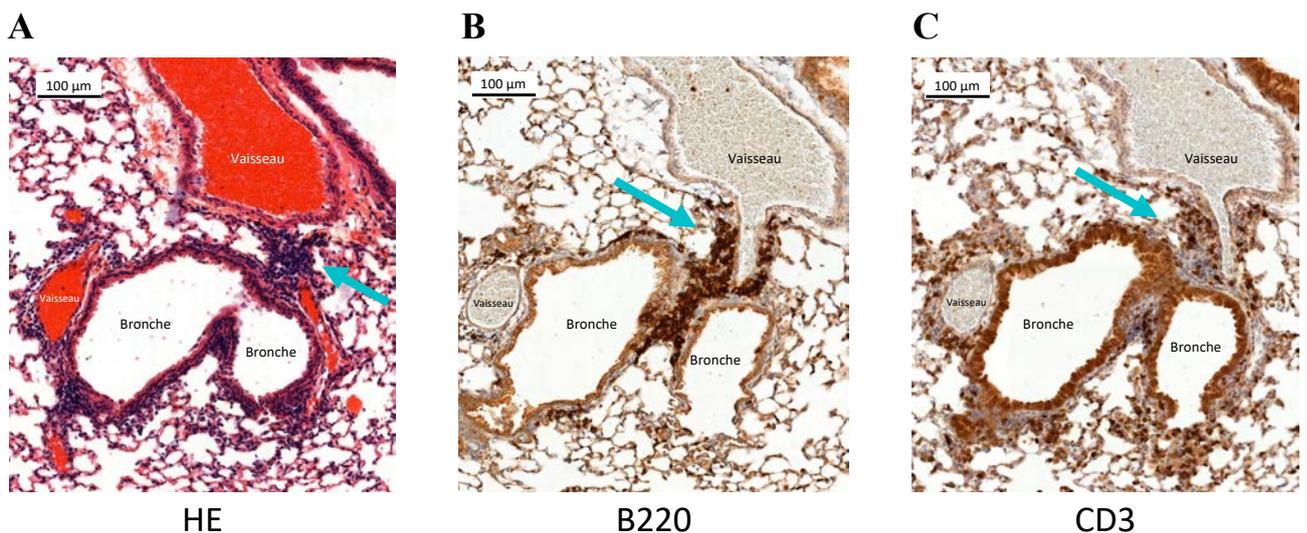


Figure 15 - Les follicules sont composés de lymphocytes B et T. Coupes d'un follicule pulmonaire de souris du groupe « primo-infecté » à S3 après coloration à l'hématoxyline-éosine (A), immunomarquage anti-B220 (B) et anti-CD3 (C), grossissement x10. La flèche pointe vers le follicule observé au fil des coupes successives.

Parmi les trois groupes de souris, les souris naïves n'ont pas présenté d'iBALT sur les coupes histologiques obtenues à partir des poumons entiers instillés au formol puis inclus en paraffine et coloré en HE (à l'exception d'une unique souris à S3 avec 1 follicule visible). A l'inverse, de nombreux follicules évoquant des iBALT étaient présents dans les groupes « pré-exposé » et « primo-infecté » de S1 à S6 post infection.

La cinétique d'apparition et la taille moyenne des iBALT étaient différentes entre les souris pré-exposées et primo-infectées (Figure 16A). Les souris primo-infectées présentaient un nombre maximal de follicules (Figure 16B) à S3 alors que le maximum observé pour les pré-exposées était à S1. D'autre part, la taille moyenne des follicules (Figure 16C) à S3 pour les souris primo-infectées étaient significativement supérieure à celles mesurées chez les souris pré-exposées ou à d'autres points de cinétique.

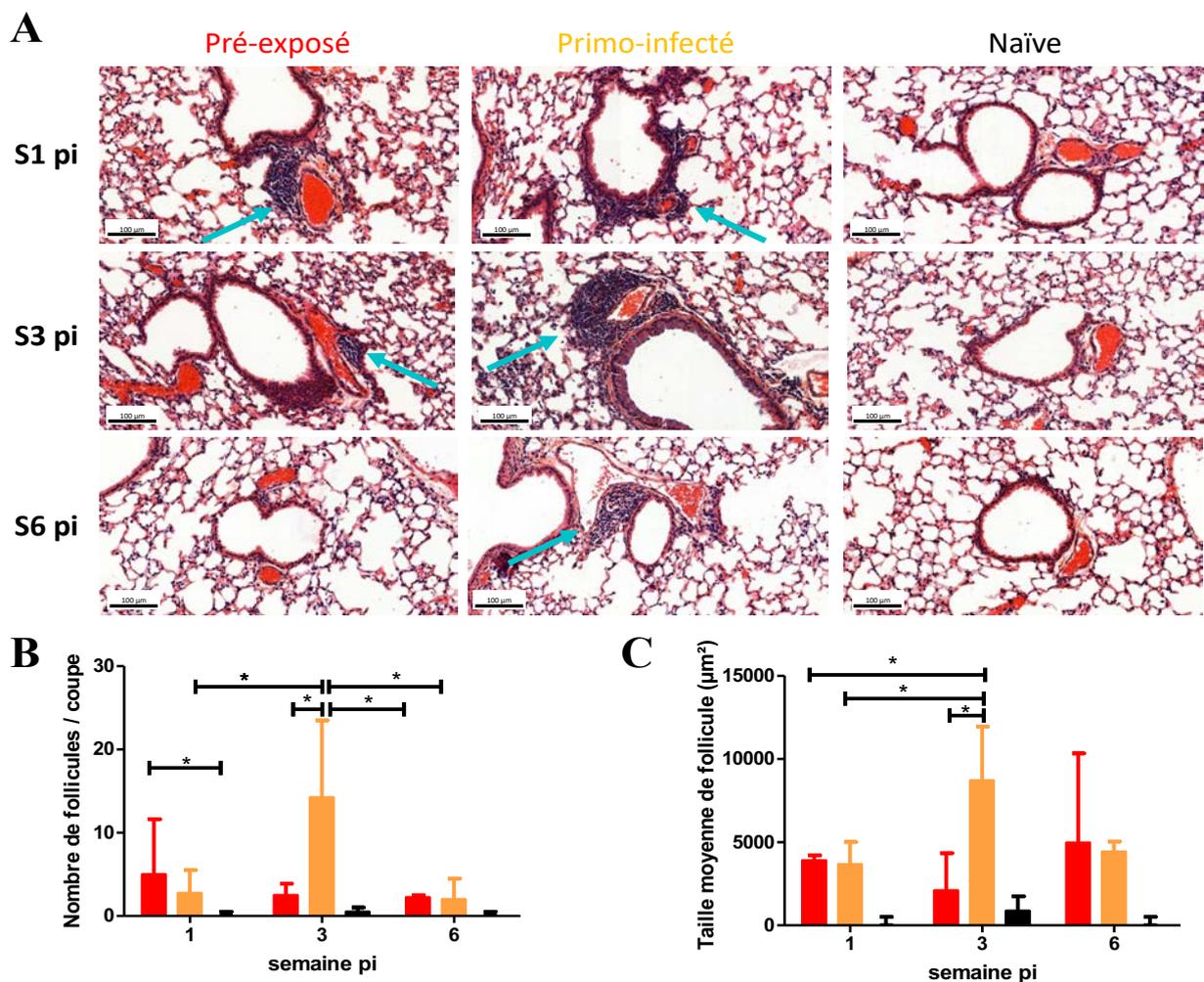


Figure 16- Cinétique des iBALT en histologie. A. Image représentative des coupes de poumons incluses en paraffine après coloration à l'hématoxyline-éosine aux différents points de cinétique, grossissement x9. Les flèches pointent vers les follicules. B. Nombre de follicule par coupe de poumons. C. Taille moyenne des follicules observés. Effectif par point : groupe « pré-exposé » en rouge n=4, groupe « primo-infecté » en orange n=4, groupe « naïf » en noir n=2. * : P < 0,05. B et C : Les bâtons représentent les médianes obtenues pour chaque groupe à chaque point de cinétique et la barre l'interquartile (25%-75%). pi : post inoculation intra-nasale.

Ainsi, les souris pré-exposées développaient plutôt des follicules de taille plus petite dès S1 alors que les souris primo-infectées présentaient une augmentation plus massive en nombre et en taille des iBALT à S3.

VI. Discussion

Au cours de ce travail, nous avons comparé les réponses immunes suite à un contact unique ou après réexposition à *P. murina* chez des souris immunocompétentes. Nous avons montré que des souris pré-exposées à *P. murina* présentaient par rapport aux souris primo-infectées i) un recrutement local et systémique de lymphocytes mémoires T CD4/CD8 à 1 semaine ; ii) une formation d'iBALT plus précoce (dès 1 semaine) avec des follicules de plus petite taille ; iii) un recrutement local d'effecteurs lymphocytaires T CD4 et T CD8 à 1 semaine ; iv) une charge fongique indétectable durant toute la durée de l'étude. Très peu de travaux ont évalué l'influence d'une primo-infection préalable sur le modèle murin de PCP et le rôle des cellules mémoires. Notre travail met en évidence un rôle central de ces cellules.

Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence un recrutement de T_{RM} CD4 et CD8 dans les poumons. Ces observations suggèrent que les T_{RM} présents au site d'infection participent à la première ligne de défense locale contre le pathogène. Les T_{RM} CD8 pourraient être localisés en première ligne dans les voies aériennes ou encore nichés dans des « dépôts de cellules mémoires associés aux lésions » (« Repair-Associated Memory Depots », RAMD) tandis que les T_{RM} CD4 seraient plutôt présents dans les iBALT, à proximité des centres germinatifs et des B_{RM} (B résident mémoire) (18). Dans la rate des souris pré-exposées, les T effecteurs et T_{EM} CD4 et CD8 étaient augmentés à une semaine d'infection, et associés à une baisse des T_{CM} CD8. Les T_{CM} pourraient, dès une semaine d'infection, être précocement différenciés en effecteurs et recrutés vers les poumons d'où une diminution dans la rate. Les T_{EM}, de par leur capacité à circuler entre les organes lymphoïdes secondaires et les tissus sont capables de se multiplier dans la rate puis de migrer ensuite vers les poumons, expliquant possiblement l'augmentation que nous observons.

De précédents travaux ont déjà montré que l'infection par *Pneumocystis* conduisait à la production de cellules mémoires. Dans une étude de Samuelson *et al.* (99), au cours d'une immunisation orale, les souris C57BL/6 étaient capables de produire localement des T_{RM} (CD69+) et d'éliminer le champignon malgré la déplétion en TCD4. Ruan *et al.* (101) ont également montré que l'Il-7 endogène, ligand naturel de CD127 favorisant la survie du lymphocyte en cellule mémoire, était produite en phase précoce, lors d'infection à *Pneumocystis* chez les souris Balb/c. De plus, l'administration d'Il-7 recombinant favorisait la clairance du champignon et la génération de T_{EM} et T_{CM} CD4 et CD8 pulmonaires chez des

souris immunocompétentes. D'autre part, Kelly *et al.* (94) ont montré un effet bénéfique du transfert adoptif de LT CD4 issus de souris immunisées contre *Pneumocystis* chez des souris RAG2^{-/-} (dépourvues de lymphocytes B et T), avec une diminution de la charge fongique, un recrutement des lymphocytes NK et une augmentation des LT CD4 majoritairement composés de cellules effectrices mémoires (CD44⁺ CD62L^{lo}). Les cellules mémoires semblent donc jouer un rôle potentiellement important dans le contrôle de *Pneumocystis*.

Dans la littérature, très peu d'études ont évalué l'effet d'une primo-infection préalable sur l'infection à *Pneumocystis*. Harmsen *et al.* (95) ont montré, qu'en réexposant des souris préalablement immunisées contre *Pneumocystis* puis en les déplétant en LT CD4, la clairance du champignon était plus rapide que chez des souris C57BL/6 non préalablement exposées. Dans une autre étude de Garvy *et al.* (85), des souris C57BL/6 Wild-type (WT), IFN- γ ^{-/-}, ou IL-4^{-/-} préalablement immunisées par inoculation de *Pneumocystis*, ont été en contact une deuxième fois avec le champignon après déplétion des lymphocytes T. Aucune de ces souris n'a développé de PCP, à la différence de toutes les souris non immunisées. Les données des études de Harmsen *et al.* (95) et Garvy *et al.* (85) montraient que la persistance de la mémoire immunitaire semblait ne pas dépendre des lymphocytes T. Cependant, les anticorps utilisés pour dépleter les lymphocytes T (anti CD4 et anti Thy1.2) peuvent dépleter certaines populations de lymphocytes T mémoires circulant ou spléniques mais ne sont pas capable de dépleter les lymphocytes T mémoires tissulaires (T_{RM}) (102).

D'autre part, l'étude de Garvy *et al.* (85) démontre l'aspect non indispensable des réponses T_{H1} et T_{H2} pour éliminer le champignon. Ceci a été confirmé par d'autres travaux, comme l'aspect non essentiel de la réponse T_{H17} (74). Nous avons montré chez des souris primo-infectées par *P. murina* une augmentation de la réponse T_{H1}, trois semaines après l'inoculation alors que des souris pré-exposées au champignon développaient, en plus de la réponse T_{H1}, une réponse T_{H2} et T_{H17} dès une semaine d'infection. Nos résultats suggèrent une meilleure stimulation de la réponse T CD4 globale au cours d'un second contact avec *Pneumocystis* même si probablement chacune de ces sous-populations n'est pas indispensable au contrôle du champignon.

A l'inverse, les populations de CD8 et macrophages pourraient jouer un rôle important vis-à-vis de *Pneumocystis* lors de réexposition. Dans une étude de De la Rua *et al.* (92), en l'absence des LT CD8 ou des macrophages alvéolaires, les souris préalablement immunisées

n'éliminaient plus le champignon. De plus, les IgG anti-*Pneumocystis* produites suite à ce premier contact permettent une diminution de la charge fongique de façon dose-dépendante *via* l'opsonisation puis la lyse par les macrophages. La mémoire immunitaire de l'hôte dans la PCP semble impliquer les T CD8, les macrophages alvéolaires et les anticorps spécifiques pour la clairance du champignon. Nos données, montrant une augmentation à une semaine d'infection des lymphocytes T CD8 INF γ ⁺ ou Granzyme B⁺, corroborent cette hypothèse.

Au cours de ce travail, nous avons montré que les souris pré-exposées à *P. murina* étaient capables de développer des modifications tissulaires de type iBALT. Des iBALT ont déjà été décrits au cours des infections à *Pneumocystis* par Eddens *et al.* (14). Ces structures apparaissaient de manière concomitante à l'augmentation de la charge fongique pour les souris C57BL/6 primo-infectées immunocompétentes. Ces résultats sont ultérieurement confirmés par des données de l'équipe puisque des structures évoquant des iBALT ont été mises en évidence lors d'une primo-infection à *P. murina* chez des souris Balb/c immunocompétentes. Ces follicules étaient composés de lymphocytes B et T en histologie et l'immunophénotypage a montré une augmentation dans le tissu pulmonaire des lymphocytes B des centres germinatifs et des T folliculaire helper (T_{FH}) (données non publiées). Les T_{FH} appartiennent à une sous-population lymphocytaire T CD4 participant à la coopération B et T dans le centre germinatif. Ils expriment entre autres les récepteurs CD40 et CXCR5 (récepteur permettant aux LT de migrer en réponse à CXCL13 vers le centre germinatif (1)) et sécrètent de grandes quantités d'Il-21. Elsegeiny *et al.* (74) ont montré qu'un déficit en Il-21 ou en Il-21R diminuaient la clairance du champignon. Le duo lymphocytes B du centre germinatif – T_{FH} semble d'une importance notable dans la réponse contre *Pneumocystis*.

Pour les souris pré-exposées, ces structures folliculaires étaient produites de manière plus précoce (dès une semaine d'infection), en même temps que le recrutement des effecteurs T et des cellules mémoires. Cependant ces iBALT présentaient une plus petite taille par rapport à ceux des souris primo-infectées. Ces résultats nous indiquent que lors d'un deuxième contact, les iBALT jouent un rôle précoce dans le contrôle de l'infection possiblement par l'hébergement des CD4 T_{RM} (18).

Les iBALT pourraient donc participer à l'élimination du champignon en favorisant la présentation antigénique ainsi que la prolifération et la coopération des lymphocytes B et T dans le tissu pulmonaire. Ces structures pourraient être le lieu du priming précoce des lymphocytes T CD4 effecteurs par les LB, que l'on sait indispensable à la clairance du champignon (90). Cependant, à distance de l'infection, les iBALT (ou les résidus de ces

iBALT) pourraient aussi constituer une sorte de « sanctuaire » pour les CD4 T_{RM} (18), permettant un développement plus rapide et efficace de la réponse immune lors d'un deuxième contact avec le champignon. Enfin, les structures type iBALT n'ont jamais été retrouvées à notre connaissance chez un hôte immunodéprimé présentant une PCP (VIH ou non-VIH).

L'ensemble des souris pré-exposées avaient une charge indétectable par qPCR contrairement aux souris primo-infectées. Une cinétique d'élimination rapide avait déjà été constatée chez des rats (96) et souris C57BL/6 (72,92) immunocompétents pré-exposés à *Pneumocystis*. Nos résultats suggèrent que l'ensemble des réponses lymphocytaires et tissulaires déployées conduisent à une clairance accélérée du champignon lors d'un deuxième contact.

Toutes ces observations sont en faveur du développement d'une réponse globale plus efficace chez les souris déjà exposées à *P. murina*. Ayant subi une primo-infection et généré des cellules mémoires, ces souris étaient alors capables de répondre de manière plus rapide (dès la 1^{ère} semaine). Cette réponse est probablement initiée au niveau local grâce aux T_{RM} préalablement sensibilisés par le pathogène, puis s'amplifie au niveau systémique (T_{CM}, T_{EM}). Les iBALT contenant possiblement des T_{RM} CD4 seraient rapidement stimulés et se reconstitueraient. Dans ces structures, la coopération lymphocytes B et T y est très étroite et efficace, permettant, d'après nos données, un priming global et non spécifique plus précoce des effecteurs T CD4 et CD8. Ces effecteurs présents dans le tissu pulmonaire seraient alors capables d'induire un environnement favorable à une polarisation précoce des macrophages de type M2, indispensables à la clairance de *Pneumocystis* d'après les données de la littérature (93). Bien que produits suite au contact avec *Pneumocystis*, les anticorps spécifiques améliorent la réponse mais ne sont pas indispensables à la clairance du champignon d'après le travail de Lund *et al.* (88). Il sera cependant nécessaire de procéder à la quantification de ces anticorps (travail en cours sur les sérums récoltés pendant cette expérimentation) pour évaluer la réponse humorale dans ce modèle, mais aussi pour s'assurer que les souris étaient bien naïves vis-à-vis de *Pneumocystis* avant le début de l'expérimentation.

Enfin, ces données constituent des résultats préliminaires obtenus à partir d'une seule expérience. Certaines de nos observations sont des tendances qui devront être confirmées par de plus grands effectifs.

VII. Conclusion

En conclusion, ces résultats confirment notre hypothèse initiale : les souris ayant déjà rencontré le pathogène au préalable ont développé une réponse immunitaire différente, plus précoce que les souris primo-infectées. Ce modèle d'infection incluant une phase de premier contact avec *Pneumocystis* constituerait ainsi un reflet plus fidèle de la réalité de l'infection chez l'Homme par le champignon. A ce jour, aucune étude sur les effets d'un premier contact n'a été réalisée sur un modèle de PCP basé sur une immunodépression par corticoïdes ; or il s'agit actuellement de la situation la plus fréquente d'acquisition d'une PCP. Ce type d'approche permettrait peut-être de mieux identifier les types cellulaires indispensables à la résolution de la PCP et donc de développer des moyens de prophylaxie ou des thérapeutiques innovantes pour prendre en charge la maladie de manière plus optimale.

Les éléments mis en lumière lors de ce travail ont été présentés au Congrès conjoint annuel des Sociétés Françaises de Parasitologie et de Mycologie Médicale ayant eu lieu à Rouen en Juin 2022 (annexe 3).

Bibliographie

1. Elsevier Masson, editor. Immunologie fondamentale et immunopathologie: enseignements thématique et intégré tissu lymphoïde et sanguin, immunopathologie et immuno-intervention. 2e édition. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson; 2018. 117–123 p.
2. Netea MG, Domínguez-Andrés J, Barreiro LB, Chavakis T, Divangahi M, Fuchs E, et al. Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2020 Jun;20(6):375–88.
3. Artis D, Spits H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature*. 2015 Jan 15;517(7534):293–301.
4. Les lymphocytes Trm, sentinelles du système immunitaire [Internet]. Planet-Vie. [cited 2022 Jun 11]. Available from: <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/animaux/systeme-immunitaire/les-lymphocytes-trm-sentinelles-du-systeme-immunitaire>
5. Jouan Y, Si-Tahar M, Guillon A. Immunité de la muqueuse respiratoire : physiologie et implications en réanimation. *Médecine Intensive Réanimation* [Internet]. 2016 Nov 17 [cited 2022 Jul 23]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13546-016-1245-9>
6. Carillo S. Histologie de l'appareil respiratoire - Voies aériennes profondes. 2004 Nov.
7. Glasser JR, Mallampalli RK. Surfactant and its role in the pathobiology of pulmonary infection. *Microbes Infect*. 2012 Jan;14(1):17–25.
8. Randall TD. Bronchus-associated lymphoid tissue (BALT) structure and function. *Adv Immunol*. 2010;107:187–241.
9. Moyron-Quiroz JE, Rangel-Moreno J, Kusser K, Hartson L, Sprague F, Goodrich S, et al. Role of inducible bronchus associated lymphoid tissue (iBALT) in respiratory immunity. *Nat Med*. 2004 Sep;10(9):927–34.
10. Carragher DM, Rangel-Moreno J, Randall TD. Ectopic lymphoid tissues and local immunity. *Semin Immunol*. 2008 Feb;20(1):26–42.
11. Hwang JY, Randall TD, Silva-Sanchez A. Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue: Taming Inflammation in the Lung. *Front Immunol*. 2016;7:17.
12. Rangel-Moreno J, Carragher DM, Garcia-Hernandez M de la L, Hwang JY, Kusser K, Hartson L, et al. The development of inducible Bronchus Associated Lymphoid Tissue (iBALT) is dependent on IL-17. *Nat Immunol*. 2011 Jun 12;12(7):639–46.
13. Silva-Sanchez A, Randall TD. Role of iBALT in Respiratory Immunity. Kabashima K, Egawa G, editors. *Inducible Lymphoid Organs*. 2020 Jan 24;426:21–43.
14. Eddens T, Elsegeiny W, Garcia-Hernandez M de la L, Castillo P, Trevejo-Nunez G, Serody

- K, et al. Pneumocystis -Driven Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissue Formation Requires Th2 and Th17 Immunity. *Cell Rep.* 2017 Mar;18(13):3078–90.
15. Tan HX, Esterbauer R, Vandervan HA, Juno JA, Kent SJ, Wheatley AK. Inducible Bronchus-Associated Lymphoid Tissues (iBALT) Serve as Sites of B Cell Selection and Maturation Following Influenza Infection in Mice. *Front Immunol.* 2019 Mar 29;10:611.
 16. Takamura S. Niches for the Long-Term Maintenance of Tissue-Resident Memory T Cells. *Front Immunol.* 2018 May 31;9:1214.
 17. Zheng MZM, Wakim LM. Tissue resident memory T cells in the respiratory tract. *Mucosal Immunol.* 2022 May;15(3):379–88.
 18. Humphries DC, O'Connor RA, Larocque D, Chabaud-Riou M, Dhaliwal K, Pavot V. Pulmonary-Resident Memory Lymphocytes: Pivotal Orchestrators of Local Immunity Against Respiratory Infections. *Front Immunol.* 2021 Sep 17;12:738955.
 19. Wang J, Li F, Tian Z. Role of microbiota on lung homeostasis and diseases. *Sci China Life Sci.* 2017 Dec;60(12):1407–15.
 20. Enaud R, Prevel R, Ciarlo E, Beaufils F, Wieërs G, Guery B, et al. The Gut-Lung Axis in Health and Respiratory Diseases: A Place for Inter-Organ and Inter-Kingdom Crosstalks. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:9.
 21. Ichinohe T, Pang IK, Kumamoto Y, Peaper DR, Ho JH, Murray TS, et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2011 Mar 29;108(13):5354–9.
 22. Arrieta MC, Stiemsma LT, Dimitriu PA, Thorson L, Russell S, Yurist-Doutsch S, et al. Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma. *Sci Transl Med [Internet].* 2015 Sep 30 [cited 2022 Sep 17];7(307). Available from: <https://www.science.org/doi/10.1126/scitranslmed.aab2271>
 23. Tipton L, Ghedin E, Morris A. The lung mycobioome in the next-generation sequencing era. *Virulence.* 2017 Apr 3;8(3):334–41.
 24. Chagas C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1909 Aug;1(2):159–218.
 25. Dei Cas E, Soulez B, Palluault F, Charet P, Camus D. *Pneumocystis carinii*, un défi pour le biologiste. *médecine/sciences.* 1990;6(6):517–25.
 26. Frenkel JK. *Pneumocystis jiroveci* n. sp. from man: morphology, physiology, and immunology in relation to pathology. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1976 Oct;43:13–30.
 27. 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*. 1988 Aug 11;334(6182):519–22.
28. James R. Stringer, Charles B. Beard, Robert F. Miller, and Ann E. Wakefield. A New Name (*Pneumocystis jirovecii*) for *Pneumocystis* from Humans. *Infect Dis Clin Pract*. 2002 Jun;11(5):323–4.
 29. Adler D, Chenivresse C, Similowski T, Soccac PM. Pneumocystose chez le patient immunosupprimé non VIH. *Rev Médicale Suisse*. 2008;5.
 30. Thomas CF, Limper AH. Current insights into the biology and pathogenesis of *Pneumocystis pneumonia*. *Nat Rev Microbiol*. 2007 Apr;5(4):298–308.
 31. Hauser PM. *Pneumocystis* Mating-Type Locus and Sexual Cycle during Infection. *Microbiol Mol Biol Rev MMBR*. 2021 Aug 18;85(3):e0000921.
 32. Keely SP, Stringer JR. Sequences of *Pneumocystis carinii* f. sp. *hominis* strains associated with recurrent pneumonia vary at multiple loci. *J Clin Microbiol*. 1997 Nov;35(11):2745–7.
 33. 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 Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2001 Mar 15;32(6):855–61.
 34. Ponce CA, Gallo M, Bustamante R, Vargas SL. *Pneumocystis* Colonization Is Highly Prevalent in the Autopsied Lungs of the General Population. *Clin Infect Dis*. 2010 Feb;50(3):347–53.
 35. de Boer MGJ, Bruijnesteijn van Coppenraet LES, Gaasbeek A, Berger SP, Gelinck LBS, van Houwelingen HC, et al. An outbreak of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia with 1 predominant genotype among renal transplant recipients: interhuman transmission or a common environmental source? *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2007 May 1;44(9):1143–9.
 36. Dellière S, Gits-Muselli M, Bretagne S, Alanio A. Outbreak-Causing Fungi: *Pneumocystis jirovecii*. *Mycopathologia* [Internet]. 2019 Nov 28 [cited 2022 Jul 18]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11046-019-00408-w>
 37. HAS. Haute Autorité de Santé -Évaluation des actes de diagnostic biologique de la pneumocystose (*Pneumocystis jirovecii*) [Internet]. 2017 Sep p. 90. Available from: www.has-sante.fr
 38. Tedersoo L, Bahram M, Põlme S, Kõljalg U, Yorou NS, Wijesundera R, et al. Global diversity and geography of soil fungi. *Science*. 2014 Nov 28;346(6213):1256688.
 39. Valade S, Azoulay E, Damiani C, Derouin F, Totet A, Menotti J. *Pneumocystis jirovecii*

- airborne transmission between critically ill patients and health care workers. *Intensive Care Med.* 2015 Sep;41(9):1716–8.
40. 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.* 2010 Jan 29;5(1):e8524.
 41. 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.
 42. Morris A, Norris KA. Colonization by *Pneumocystis jirovecii* and its role in disease. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Apr;25(2):297–317.
 43. Vera C, Rueda ZV. Transmission and Colonization of *Pneumocystis jirovecii*. *J Fungi.* 2021 Nov 18;7(11):979.
 44. Vanek J, Jirovec O. [Parasitic pneumonia. Interstitial plasma cell pneumonia of premature, caused by pneumocystis Carinii]. *Zentralblatt Bakteriologie Parasitenkunde Infektionskrankheiten Hygiene 1. Abteilung Medizinische Bakteriologie Virusforschung Parasitologie Originale.* 1952 May 12;158(1–2):120–7.
 45. Gottlieb MS, Schroff R, Schanker HM, Weisman JD, Fan PT, Wolf RA, et al. *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med.* 1981 Dec 10;305(24):1425–31.
 46. Vanley GT, Huberman R, Lufkin RB. Atypical *Pneumocystis carinii* pneumonia in homosexual men with unusual immunodeficiency. *AJR Am J Roentgenol.* 1982 Jun;138(6):1037–41.
 47. El Fane M, Sodqi M, Oulad Lahsen A, Chakib A, Marih L, Marhoum El Filali K. La pneumocystose au cours de l'infection à VIH. *Rev Pneumol Clin.* 2016 Aug;72(4):248–54.
 48. Lot F, Costa CD, Semaille C. Les pathologies inaugurales de sida, France, 2003-2010. 2011 Nov 29;5.
 49. Bretagne S, Sitbon K, Desnos-Ollivier M, Garcia-Hermoso D, Letscher-Bru V, Cassaing S, et al. Active Surveillance Program to Increase Awareness on Invasive Fungal Diseases: the French RESSIF Network (2012 to 2018). Chiller T, editor. *mBio.* 2022 May 2;e00920-22.
 50. 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.
51. 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. *Emerg Infect Dis*. 2014 Sep;20(9):1490–7.
 52. 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*. 1989 Nov;140(5):1204–9.
 53. Rouyer M, Stoclin A, Blanc FX. La pneumocystose chez le patient adulte non infecté par le VIH. *Rev Mal Respir*. 2015 Dec;32(10):985–90.
 54. Khellaf M, Godeau B. Pneumocystose au cours des maladies systémiques. *Presse Médicale*. 2009 Feb;38(2):251–9.
 55. Iriart X, Witkowski B, Courtais C, Abbes S, Tkaczuk J, Courtade M, et al. Cellular and cytokine changes in the alveolar environment among immunocompromised patients during Pneumocystis jirovecii infection. *Med Mycol*. 2010 Dec;48(8):1075–87.
 56. Cissé OH, Pagni M, Hauser PM. De novo assembly of the Pneumocystis jirovecii genome from a single bronchoalveolar lavage fluid specimen from a patient. *mBio*. 2012 Dec 26;4(1):e00428-00412.
 57. Ma L, Huang DW, Cuomo CA, Sykes S, Fantoni G, Das B, et al. Sequencing and characterization of the complete mitochondrial genomes of three Pneumocystis species provide new insights into divergence between human and rodent Pneumocystis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. 2013 May;27(5):1962–72.
 58. Valero C, Buitrago MJ, Gits-Muselli M, Benazra M, Sturny-Leclère A, Hamane S, et al. Copy Number Variation of Mitochondrial DNA Genes in Pneumocystis jirovecii According to the Fungal Load in BAL Specimens. *Front Microbiol*. 2016;7:1413.
 59. Guegan H, Robert-Gangneux F. Molecular diagnosis of Pneumocystis pneumonia in immunocompromised patients: *Curr Opin Infect Dis*. 2019 Aug;32(4):314–21.
 60. Le Gal S, Robert-Gangneux F, Pépino Y, Belaz S, Damiani C, Guéguen P, et al. A misleading false-negative result of Pneumocystis real-time PCR assay due to a rare punctual mutation: A French multicenter study. *Med Mycol*. 2017 Feb 1;55(2):180–4.
 61. 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*. 2008 Oct;75(2):258–61.
 62. Fillaux J, Berry A. Real-time PCR assay for the diagnosis of Pneumocystis jirovecii pneumonia. *Methods Mol Biol Clifton NJ*. 2013;943:159–70.

63. Roux A, Lemiale V, Kouatchet A, Vincent F, Bollée G, Roux P, et al. Pneumocystose pulmonaire en dehors de l'infection à VIH. *Réanimation*. 2010 Jun;19(4):327–38.
64. Hughes WT, Kuhn S, Chaudhary S, Feldman S, Verzosa M, Aur RJ, et al. Successful chemoprophylaxis for *Pneumocystis carinii* pneumonitis. *N Engl J Med*. 1977 Dec 29;297(26):1419–26.
65. de la Horra C, Friaiza V, Morilla R, Delgado J, Medrano FJ, Miller RF, et al. Update on Dihydropteroate Synthase (DHPS) Mutations in *Pneumocystis jirovecii*. *J Fungi*. 2021 Oct 13;7(10):856.
66. Kazanjian P, Locke AB, Hossler PA, Lane BR, Bartlett MS, Smith JW, et al. *Pneumocystis carinii* mutations associated with sulfa and sulfone prophylaxis failures in AIDS patients. :6.
67. Wang L, Liang H, Ye L, Jiang J, Liang B, Huang J. Adjunctive corticosteroids for the treatment of *Pneumocystis jirovecii* pneumonia in patients with HIV: A meta-analysis. *Exp Ther Med*. 2016 Feb 1;11(2):683–7.
68. Charpentier E, Marques C, Ménard S, Chauvin P, Guemas E, Cottrel C, et al. New Insights into Blood Circulating Lymphocytes in Human *Pneumocystis* Pneumonia. *J Fungi*. 2021 Aug 11;7(8):652.
69. 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*. 2011 Aug 15;204(4):544–53.
70. Martin-Garrido I, Carmona EM, Specks U, Limper AH. *Pneumocystis* Pneumonia in Patients Treated With Rituximab. *Chest*. 2013 Jul;144(1):258–65.
71. 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 Apr;50:e23–4.
72. Elsegeiny W, Eddens T, Chen K, Kolls JK. Anti-CD20 Antibody Therapy and Susceptibility to *Pneumocystis* Pneumonia. Deepe GS, editor. *Infect Immun*. 2015 May;83(5):2043–52.
73. Chesnay A, Paget C, Heuzé-Vourc'h N, Baranek T, Desoubieux G. *Pneumocystis* Pneumonia: Pitfalls and Hindrances to Establishing a Reliable Animal Model. *J Fungi*. 2022 Jan 27;8(2):129.
74. Elsegeiny W, Zheng M, Eddens T, Gallo RL, Dai G, Trevejo-Nunez G, et al. Murine models of *Pneumocystis* infection recapitulate human primary immune disorders. *JCI Insight*. 2018 Jun 21;3(12):91894.

75. An CL, Gigliotti F, Harmsen AG. Exposure of Immunocompetent Adult Mice to *Pneumocystis carinii* f. sp. muris by Cohousing: Growth of *P. carinii* f. sp. muris and Host Immune Response. *Infect Immun*. 2003 Apr;71(4):2065–70.
76. 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*. 1990 May;85(5):1686–93.
77. Swain SD, Meissner NN, Siemsen DW, McInnerney K, Harmsen AG. *Pneumocystis* Elicits a STAT6-Dependent, Strain-Specific Innate Immune Response and Airway Hyperresponsiveness. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2012 Mar;46(3):290–8.
78. Tisdale NL, Ashbaugh A, Hendrix K, Collins MS, Porollo AP, Cushion MT. The Effects of Sex and Strain on *Pneumocystis murina* Fungal Burdens in Mice. 2019 Sep 26 [cited 2022 Jul 25]; Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/781245>
79. Rong HM, 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*. 2019 Jan 1;316(1):L291–301.
80. Swain SD, Meissner N, Han S, Harmsen A. *Pneumocystis* infection in an immunocompetent host can promote collateral sensitization to respiratory antigens. *Infect Immun*. 2011 May;79(5):1905–14.
81. Charpentier E, Ménard S, Marques C, Berry A, Iriart X. Immune Response in *Pneumocystis* Infections According to the Host Immune System Status. *J Fungi Basel Switz*. 2021 Jul 31;7(8):625.
82. Shellito JE, Tate C, Ruan S, Kolls J. Murine CD4+ T lymphocyte subsets and host defense against *Pneumocystis carinii*. *J Infect Dis*. 2000 Jun;181(6):2011–7.
83. Thomas CF. *Pneumocystis* Pneumonia. *N Engl J Med*. 2004;12.
84. 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*. 1991 Aug;5(2):186–97.
85. 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*. 1997 Dec;65(12):5052–6.
86. 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*. 1992 Aug;90(2).
87. 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*. 1996 Nov;128(5):477–87.
88. 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*. 2003 Aug 1;171(3):1423–30.
89. 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*. 2006 May 15;176(10):6147–54.
90. 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 Baltim Md 1950*. 2015 Jul 15;195(2):611–20.
91. Hernandez-Novoa B, Bishop L, Logun C, Munson PJ, Elnekave 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*. 2008 Aug;84(2):420–30.
92. de la Rua NM, Samuelson DR, Charles TP, Welsh DA, Shellito JE. CD4+ T-Cell-Independent Secondary Immune Responses to *Pneumocystis* Pneumonia. *Front Immunol* [Internet]. 2016 May 11 [cited 2021 Dec 4];7. Available from: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2016.00178/abstract>
93. 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. Deepe GS, editor. *Infect Immun*. 2010;85(3):e00939-16.
94. 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 Baltim Md 1950*. 2013 Jan 1;190(1):285–95.
95. Harmsen AG, Chen W, Gigliotti F. Active immunity to *Pneumocystis carinii* reinfection in T-cell-depleted mice. *Infect Immun*. 1995 Jul;63(7):2391–5.
96. Menotti J, Emmanuel A, Boucekouk 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. Zaragoza O, editor. *PLoS ONE*. 2013 Apr 23;8(4):e62155.
97. Dai G, Noell K, Weckbecker G, Kolls JK. Effect of Subcutaneous Anti-CD20 Antibody-Mediated B Cell Depletion on Susceptibility to *Pneumocystis* Infection in Mice. *mSphere*. 2021 May 5;6(3):e01144-20.

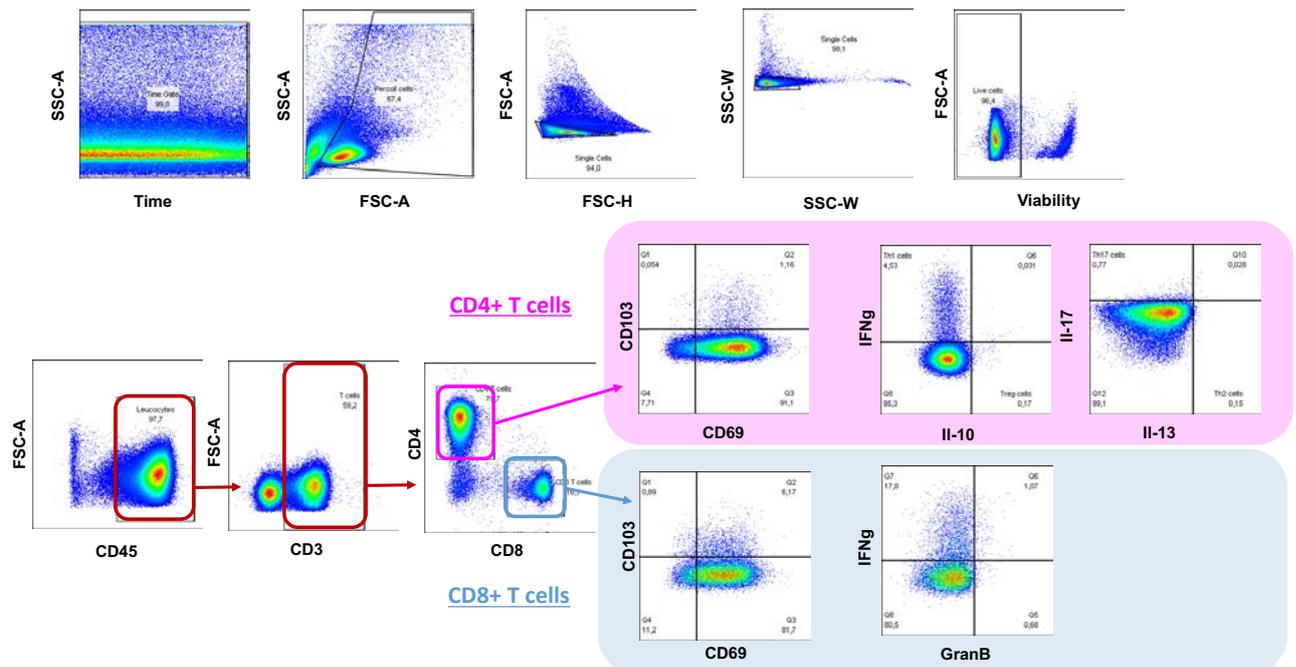
98. Gigliotti F, Hughes WT. Passive immunoprophylaxis with specific monoclonal antibody confers partial protection against *Pneumocystis carinii* pneumonitis in animal models. *J Clin Invest.* 1988 Jun 1;81(6):1666–8.
99. Samuelson DR, de la Rúa NM, Charles TP, Ruan S, Taylor CM, Blanchard EE, et al. Oral Immunization of Mice with Live *Pneumocystis murina* Protects against *Pneumocystis* Pneumonia. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2016 Mar 15;196(6):2655–65.
100. 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.* 2004 Apr 15;189(8):1540–4.
101. 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 Jan;84(1):108–19.
102. Murata A, Hayashi SI. CD4+ Resident Memory T Cells Mediate Long-Term Local Skin Immune Memory of Contact Hypersensitivity in BALB/c Mice. *Front Immunol.* 2020;11:775.

Annexe 1 – Panel utilisé ciblant les sous-populations lymphocytaires T avec stimulation par la PMA/ionomycine (A) et stratégie de gating utilisée (B) sur les poumons

A.

Marquage des poumons		
Anticorps	Fluorochrome	Dilution
FcR Block anti CD16/anti CD32	/	1/100 ^{ème}
Marqueur de viabilité	eFluor 450	1/1000 ^{ème}
Marquage extracellulaire		
CD4	BV510	1/200 ^{ème}
CD103	BV711	1/100 ^{ème}
CD69	FITC	1/100 ^{ème}
CD45	PE-CF594	1/1000 ^{ème}
CD8a	APC	1/300 ^{ème}
CD3	AF700	1/200 ^{ème}
Marquage Intracellulaire (Cytokines)		
Granzyme B	PE	1/200 ^{ème}
IFN-g	BV786/BV785	1/200 ^{ème}
IL-10	PerCP-Cy5.5/BB700	1/300 ^{ème}
IL-13	PE-Cy7	1/200 ^{ème}
IL-17A	APC-Cy7/ eFluor780	1/200 ^{ème}

B.

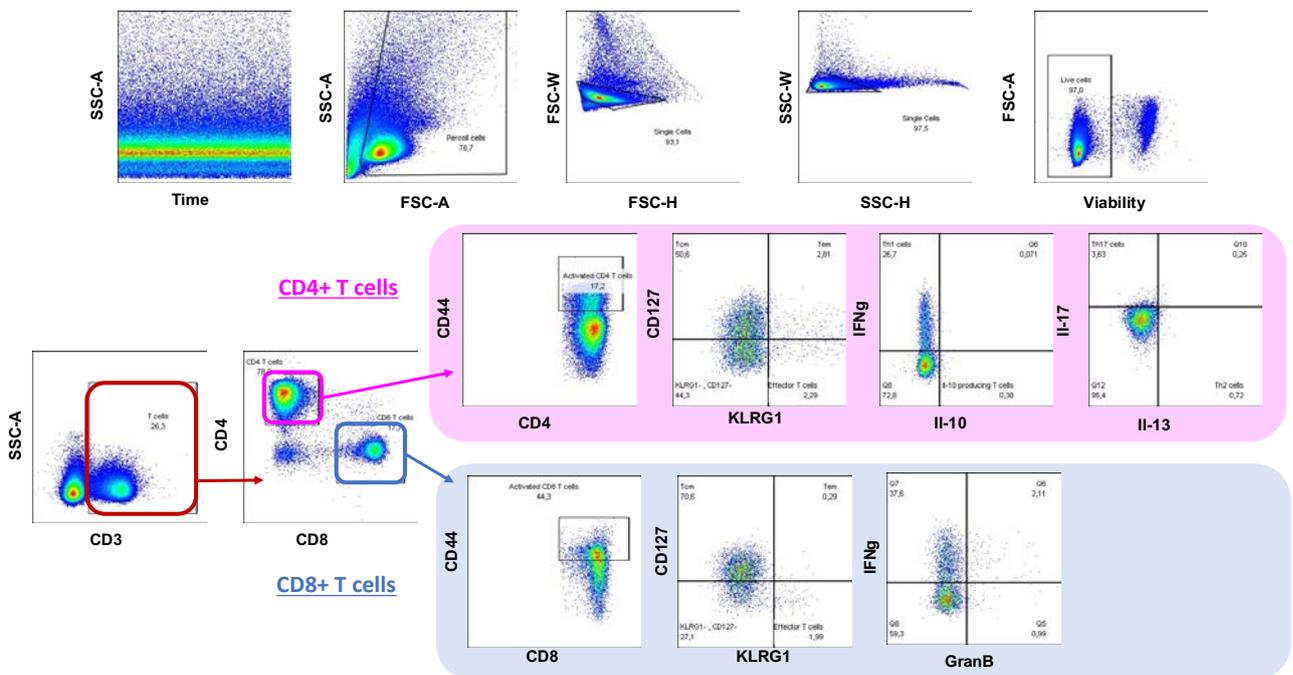


Annexe 2 – Panel utilisé ciblant les sous-populations lymphocytaires T avec stimulation par la PMA/ionomycine (A) et stratégie de gating utilisée (B) sur les rates

A.

Marquage des rates		
Anticorps	Fluorochrome	Dilution
FcR Block anti CD16/CD32	/	1/100 ^{ème}
Marqueur de viabilité	eFluor 450	1/1000 ^{ème}
Marquage extracellulaire		
CD4	BV510	1/200 ^{ème}
KLRG1	BV711	1/200 ^{ème}
CD44	FITC	1/200 ^{ème}
CD127	PE-Dazzle594	1/100 ^{ème}
CD8a	APC	1/300 ^{ème}
CD3	AF700	1/200 ^{ème}
Marquage Intracellulaire (Cytokines)		
Granzyme B	PE	1/200 ^{ème}
IFN-g	BV786/BV785	1/200 ^{ème}
IL-10	PerCP-Cy5.5/BB700	1/300 ^{ème}
IL-13	PE-Cy7	1/200 ^{ème}
IL-17A	APC-Cy7/ eFluor780	1/200 ^{ème}

B.



Impact d'un contact préalable avec *Pneumocystis murina* sur les réponses immunes lymphocytaires dans un modèle murin immunocompétent

Cottrel Claire^{1,2}, Ménard Sandie², Charpentier Elena^{1,2}, Guemas Emilie^{1,2}, Fazilleau Nicolas², Blanchard Nicolas², Berry Antoine^{1,2}, Iriart Xavier^{1,2,*}

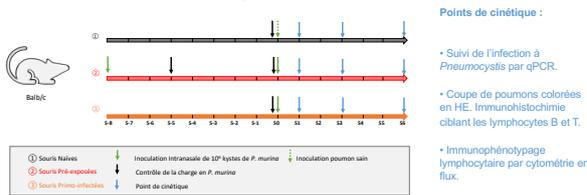
¹Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Toulouse, Toulouse, France. ²Infinity, Inserm, CNRS, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France. * corresponding author. Contact : claire.cottrel@hotmail.fr

Mots clé. *Pneumocystis*, hôte immunocompétent, modèle murin, lymphocyte

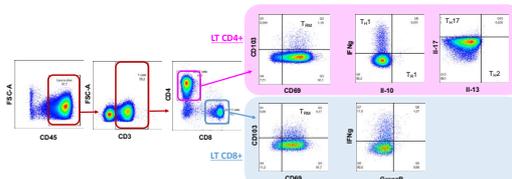
Contexte. Un hôte immunocompétent est capable d'éliminer de façon asymptomatique *Pneumocystis sp.*. De par le caractère non cultivable du champignon, les modèles murins sont un outil majeur pour comprendre l'immunopathologie de l'infection à *Pneumocystis sp.*. Bien que la séroprévalence contre *Pneumocystis* soit élevée dès le plus jeune âge chez l'Homme, témoignant d'un contact précoce avec le champignon, la majorité des études est menée sur des modèles de primo-infection. Nous émettons l'hypothèse qu'une souris pourrait avoir une réponse immunitaire différente au cours d'une primo-infection ou d'un second contact avec *P. murina*. Ce modèle incluant un premier contact pourrait être plus représentatif de la réponse immunitaire de l'hôte au cours d'une infection par *Pneumocystis sp.* chez l'Homme.

Matériel & Méthodes.

Protocole expérimental :

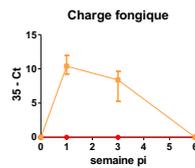


Stratégie de gating des sous-populations lymphocytaires T :

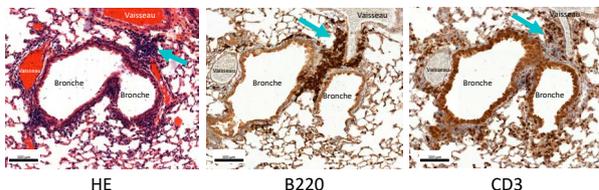


Résultats.

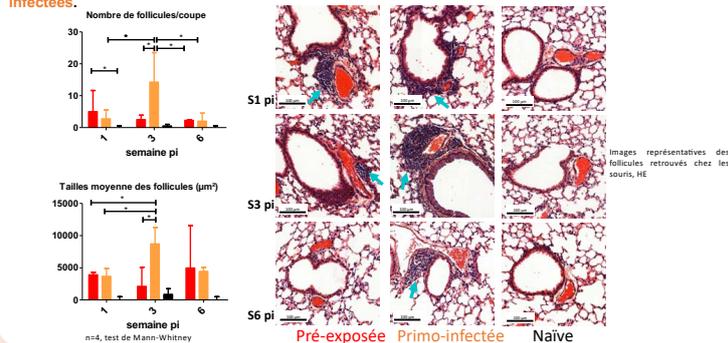
A. A la différence des souris **primo-infectées**, les souris **pré-exposées** à *P. murina* ont une **charge fongique indétectable** tout au long de l'expérimentation.



B.1 En réponse à *P. murina*, les souris produisent des follicules évoquant des **iBALT** en regard des bronches et des vaisseaux composés de **lymphocytes B et T**.



B.2 Les souris **pré-exposées** développent des **iBALT plus petits et plus précocement** que les **primo-infectées**.



Conclusions.

- Les souris **pré-exposées** à *P. murina* ont présenté par rapport aux souris **primo-infectées** : une **charge fongique indétectable** durant toute l'étude ; une formation d'**iBALT** plus précoce et de plus petite taille dès 1 semaine ; un recrutement local de lymphocytes **mémoires** T_{RM} CD4/CD8 à 1 semaine d'infection associé à une forte réponse d'**effecteurs** lymphocytaires T CD4/CD8.

- Nos résultats suggèrent que la réponse mémoire mise en place suite à l'exposition à *Pneumocystis* favoriserait la formation précoce d'iBALT. Cette réponse pourrait permettre un priming précoce des effecteurs lymphocytaires aboutissant à la clairance accélérée du champignon.

- L'importance de cette préexposition devrait être prise en compte dans de futures études, notamment celles travaillant sur les modèles murins de pneumocystose cortico-induite.



Title & Abstract:

Lymphocyte response against *Pneumocystis*: Impact of primary contact with *Pneumocystis murina* on immune response and outcome in an immunocompetent mouse model

Key words. *Pneumocystis*, immunocompetent host, mouse model, lymphocyte

Background. *Pneumocystis* pneumonia is severe fungi infection leading to 20-30 % mortality in immunocompromised patients. An immunocompetent host is able to eliminate asymptotically *Pneumocystis sp.* Due to the impossibility to cultivate the fungus, mouse model are key tools to understand immunopathophysiology during *Pneumocystis* infection. Although high seroprevalence in infants suggests early and repeated contacts with the pathogen, the vast majority of studies has focused on primary contact with *Pneumocystis*. We hypothesized that *P. murina*-experienced mice would have a different immune response during a primary infection or a reinfection. A reinfection model might be more representative of the host immune response during *Pneumocystis* infection in Human.

Materials & Methods. Three groups of mice were compared: the challenged group had a first contact with *Pneumocystis*, cleared the fungus and then was exposed a second time (Week 0) to *P. murina*; the infected group only had a first contact with *P. murina*; the naive group received an extract of *Pneumocystis*-free lungs. Lung sections, collected at 1, 3 and 6 weeks post *Pneumocystis* intranasal instillation, were stained with hematoxylin-eosin. Immunohistochemistry was performed targeting B and T cells. Lymphocyte immunophenotyping was assessed in lungs by flow cytometry and *Pneumocystis* infection was monitored by qPCR.

Results. Upon histological data, mice from both challenged and infected groups developed follicles evoking induced Bronchus-Associated Lymphoid Tissue (iBALT) structures nearby bronchi and vessels, in response to *P. murina*. Those structures composed of B and T cells, appeared earlier in the challenged mice (1 week post infection (p.i.)) compared to the infected ones (3 weeks p.i.). While the infected mice showed a fungal load from the first week p.i., the challenged mice had an undetectable fungal burden during the 6 weeks of infection suggesting a more effective fungal clearance in this group. In cytometry, the challenged mice developed 1 week p.i, a particular lymphocyte profile with an increase of Th1, Th2, Th17 and Il-10 producing CD4 T cells, and a local memory response (tissue resident memory cells).

Conclusions. The mice appeared to have a different immune response when exposed a second time to *Pneumocystis* compared to the primary infection. This mouse model seems more representative of the *Pneumocystis* infection in immunocompetent human host. Studies based on corticoid-induced immunosuppression would be interesting to assess the impact of a prior contact with *P. murina* on *Pneumocystis* pneumonia model.

Présentée et soutenue publiquement par :

COTTREL Claire, le 17 octobre 2020 à l'Institut Fédératif de Biologie, Purpan, CHU de Toulouse.

Titre : Réponse lymphocytaire contre *Pneumocystis* : impact d'un contact préalable avec *Pneumocystis murina* sur les réponses immunes et leur cinétique dans un modèle murin immunocompétent

Directeur de thèse : Docteur Iriart Xavier

Résumé :

Contexte. La pneumocystose humaine est une mycose pulmonaire grave due à *Pneumocystis jirovecii* touchant les patients immunodéprimés et entraînant 20 à 30% de mortalité. Un hôte immunocompétent est capable d'éliminer de façon asymptomatique *Pneumocystis sp.*. En raison du caractère non cultivable du champignon, les modèles murins sont un outil majeur pour comprendre l'immunopathologie de l'infection à *Pneumocystis sp.*. Bien qu'une séroprévalence élevée ait été constatée dès le plus jeune âge, la majorité des études est menée sur des modèles de primo-infection. Nous émettons l'hypothèse qu'une souris aurait une réponse immune différente au cours d'une primo-infection ou d'un second contact avec *P. murina*. Ce modèle incluant un premier contact serait plus représentatif de la réponse immune de l'hôte au cours d'une infection par *Pneumocystis sp.*.

Matériels et Méthodes. Trois groupes de souris ont été comparés : le groupe « pré-exposé » a subi une première infection à *P. murina*, a curé le champignon puis a été soumis à une seconde infection ; le groupe « primo-infecté » a subi un unique premier contact avec *P. murina* ; le groupe naïf a reçu un extrait de poumons sains. Le profil phénotypique des lymphocytes issus des poumons et rates a été déterminé par cytométrie en flux et la charge en *P. murina* a été évaluée par qPCR. Des coupes histologiques ont été réalisées à partir de poumons collectés à 1, 3 et 6 semaines après instillation intranasale de *P. murina* et ont été colorées à l'hématoxylin-éosine. Un immunomarquage ciblant les lymphocytes B et T a également été réalisé sur ces coupes.

Résultats. Alors qu'une charge fongique était observée dès 1 semaine post infection chez les souris primo-infectées, aucune souris pré-exposées ne présentaient de charge détectable pendant les 6 semaines d'expérimentation, suggérant une clairance plus efficace du champignon. En cytométrie, les souris pré-exposées ont développé à 1 semaine post infection, une réponse lymphocytaire particulière avec une augmentation des populations T_H1 , T_H2 , T_H17 et T cytotoxiques et des cellules mémoires. L'histologie montrait des structures iBALT-like en regard des bronches et des vaisseaux chez les souris pré-exposées et primo-infectées. Ces structures composées de B et de T apparaissaient plus précocement chez les souris pré-exposées (semaine 1) comparativement aux souris primo-infectées (semaine 3).

Conclusion. Les souris avaient une réponse immune plus rapide lors d'une seconde exposition à *P. murina* comparées aux souris primo-infectées. Le modèle de réexposition présenté dans ce travail est plus représentatif de la réponse immune réelle déployée chez un hôte infecté. Appliqué à des souris immunodéprimées par les corticoïdes, il permettrait d'étudier l'impact d'un précédent contact avec le champignon au cours d'une pneumocystose.

DISCIPLINE administrative : Diplôme d'études spécialisées en Biologie Médicale

MOTS-CLES : *Pneumocystis*, hôte immunocompétent, modèle murin, lymphocyte

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE : Parasitologie – Mycologie CHU de Toulouse Purpan
Institut Fédératif de Biologie (IFB), 330 Avenue de Grande Bretagne 31059 Toulouse