

Thèse de Doctorat

Barbara MISME-AUCOUTURIER

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Spécialité : Biologie des organismes

Unité de recherche : Laboratoire IICiMed UPRES EA 1155

Institut de Recherche en Santé 2

22 Boulevard Bénoni Goullin

44200 Nantes

Soutenue le 5 Juillet 2017

Thèse N° : (10)

Le granulome à *Candida* : Modèle de persistance pour l'étude de l'interaction hôte-pathogène

JURY

Président du jury : **Frédéric DALLE**, Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Bourgogne

Rapporteurs : **Christine IMBERT**, Professeur d'université, Université de Poitiers

Directeur de Thèse : **Patrice LE PAPE**, Professeur d'université – Praticien Hospitalier, Université de Nantes

Co-encadrant de Thèse : **Nidia ALVAREZ-RUEDA**, Maître de conférence, Université de Nantes

A Loïc

A toute ma famille et mes proches disparus

Remerciements

Je tenais à remercier l'ensemble des membres du jury : le Pr Christine Imbert et le Pr Frédéric Dalle de me faire l'honneur de juger ce travail.

Ce travail a été réalisé au sein du Laboratoire IICiMed, Département de Parasitologie et de Mycologie Médicales de l'Université de Nantes, EA1155, sous la direction du Pr Patrice Le Pape. Je tenais à vous remercier de m'avoir accueillie au sein de votre équipe et de m'avoir encadré tout au long de ce travail.

Je tenais également à remercier Nidia Alvarez-Rueda de m'avoir encadré au cours de ces années de thèse. Merci pour tes conseils et ton encadrement.

Un immense merci à l'ensemble des membres de l'EA1155 pour leur accueil, leur soutien, leur aide et les bons moments passés ensemble, mais aussi pour les crises de rire avec nos phrases plus ou moins correctes au tableau !

Un merci tout particulier à Marjorie pour son aide pour tous de ces « très » longs lundi « à faire du granulome » !

Merci aux membres de la plate-forme de cytométrie en flux Cytocell pour leurs conseils et leur savoir-faire.

Enfin, un immense merci à mes amis, à ma famille et à Loïc pour leur écoute et leur soutien mais aussi leur réconfort et leur présence de tous les instants.

Résumé

Les levures du genre *Candida*, champignons microscopiques saprophytes de l'Homme, peuvent par leur caractère opportuniste causer des pathologies appelées candidoses. Dans le cadre des candidoses chroniques, il existe deux principaux types d'infections : les candidoses disséminées chroniques (CDC) ou hépatospléniques et les candidoses cutanéomuqueuses chroniques (CMCD). Dans ces deux entités cliniques, la présence de granulomes a été mise en évidence mais leur rôle dans la physiopathologie est encore peu étudié. En utilisant un modèle humain *in vitro* de granulome fongique à *Candida*, nous avons caractérisé la réponse granulomateuse de sujets sains immunocompétents lors de l'infection par 8 espèces de *Candida* rencontrées en clinique (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* et *C. kefyr*). Différents paramètres ont été étudiés : le nombre, la taille et la cinétique de formation des granulomes, l'évolution de la charge fongique selon les espèces, ainsi que la nature des cellules immunitaires impliquées dans la formation du granulome et la cinétique de production de cytokines. Différents profils de réponse ont été mis en évidence dont des individus qui ne contrôlent pas l'infection (persistance du pathogène) et d'autres pour lesquels il y a clairance de *Candida* au sein des granulomes. Nous avons pour la première fois mis en évidence une proportion plus importante de cellules T doubles positives CD4^{lo}CD8^{hi} dans les granulomes où l'infection persiste. Enfin, une variabilité inter et intra-individuelle dans la réponse granulomateuse et dans l'issue de l'infection elle-même a été mise en évidence.

Mots-clés : *Candida* spp., granulome, interactions hôte-pathogène, persistance, réponse immune.

***Candida* granuloma: persistence model for the study of host-pathogen interaction**

Candida species, microscopic and saprophytic human fungus, can by their opportunist character cause pathologies called candidiasis. In the framework of the chronic candidiasis, there are two main types of *Candida* infections: chronic disseminated candidiasis (CDC) or hepatosplenic candidiasis and chronic mucocutaneous candidiasis (CMC). During these two clinical manifestations, the presence of granulomas was highlighted but their role in physiopathology is remains poorly documented. Using in vitro model of human *Candida* granuloma, we characterized the granulomateuse response of immunocompetent healthy subjects during infection by 8 clinically revelant *Candida* species (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* and *C. kefyr*). Various parameters were followed: number, size and kinetics of granulomas formation, fungal burden evolution according to species, so the nature of immune cells involved in granulomas formation and the cytokines production. Different responses profiles were highlighted: individuals who not control infection (persistence of the pathogen) and others for which there's *Candida* clearance within granulomas. For the first time, we highlighted a more important proportion of T cells CD4^{lo}CD8^{hi} doubly positive in persistent infection granulomas. Finally, inter and intra-variability in the granulomatous response as well as the *Candida* infection outcome were showed.

Key Words: *Candida* spp., granuloma, host-pathogen interactions, persistance, immune response.

Table des matières

Partie I Analyse bibliographique	12
CHAPITRE I : CARACTERISTIQUES GENERALES DU GENRE <i>CANDIDA</i>.....	13
1. Le genre <i>Candida</i>	14
1.1. Caractéristiques générales.....	14
1.2. Classification taxonomique du genre <i>Candida</i>	16
1.3. Principales espèces de <i>Candida</i> d'intérêt médical.....	20
1.4. Paroi fongique et ses principaux constituants :	25
CHAPITRE II : LES CANDIDOSES	29
1. Les candidoses superficielles.....	30
1.1. Les candidoses cutanées et unguéales.....	30
1.2. Les candidoses des muqueuses.....	31
1.2.1. Les candidoses uro-génitales.....	31
1.2.2. Les candidoses digestives.....	32
1.3. Les candidoses cutanéomuqueuses chroniques.....	33
2. Les candidoses invasives ou profondes.....	34
2.1. Les septicémies à <i>Candida</i>	35
2.2. Les candidoses disséminées.....	36
3. Facteurs de risques des candidoses.....	38
3.1. Facteurs de risque liés à l'hôte (intrinsèques).....	38
3.1.1. Facteurs physiologiques.....	38
3.1.2. Maladies sous-jacentes.....	39
3.2. Facteurs de risque extrinsèques.....	39
3.2.1. Facteurs alimentaires.....	39
3.2.2. Antibiothérapie à large spectre.....	40
3.2.3. Traitements immunosuppresseurs et anti-cancéreux.....	40
3.2.4. Cathéters et autres dispositifs intraveineux.....	40
3.2.5. Transplantation d'organes solides.....	40
3.2.6. Soins intensifs et chirurgie.....	41
4. Diagnostic des candidoses.....	42
5. Prise en charge thérapeutique des candidoses.....	43
CHAPITRE III : L'INTERACTION HOTE-<i>CANDIDA</i>.....	47
1. Notions générales.....	48
2. Facteurs spécifiques à <i>Candida</i> :	50
2.1. Production d'adhésines.....	52
2.2. Production d'enzymes hydrolytiques.....	53
2.3. L'activité hémolytique.....	55
2.4. Le dimorphisme.....	55
2.5. Le tropisme des hyphes.....	57
2.6. Les changements phénotypiques.....	59
2.7. Formation de biofilm.....	60
3. Facteur spécifique à l'hôte : l'immunité anti-<i>Candida</i>.....	63
3.1. L'immunité innée vis-à-vis de <i>Candida</i>	64
3.1.1. Interactions PAMPs et PRRs.....	65
3.1.2. Interactions de <i>Candida</i> avec les cellules de l'immunité innée.....	67
3.1.2.1. Les neutrophiles.....	67
3.1.2.2. Les monocytes et macrophages.....	75
3.1.2.3. Les cellules Natural Killer (NK).....	79
3.1.2.4. Les cellules dendritiques.....	83
3.2. L'immunité adaptative vis-à-vis de <i>Candida</i>	85

3.2.1. Les lymphocytes T	86
3.2.2. Les lymphocytes B	89
CHAPITRE IV : LE GRANULOME A <i>CANDIDA</i>.....	92
1. Le granulome	94
1.1. Définition	94
1.2. Développement du granulome	94
1.3. Histopathologie des granulomes.....	96
1.3.1. Granulomes épithélio-giganto-cellulaires avec ou sans nécrose.....	96
1.3.2. Granulomes à aspect palissadique des cellules épithélioïdes.....	98
1.3.3. Granulomes pyo épithélioïdes ou suppurants.....	98
1.3.4. Granulomes avec anneau de fibrine.....	99
1.3.5. Granulomes à corps étranger.....	100
1.4. Devenir du granulome	100
2. Importance des granulomes en microbiologie et en mycologie médicales..	101
2.1. Les granulomes bactériens	101
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	102
2.2. Les granulomes parasitaires	105
2.2.1. <i>Schistosoma mansoni</i>	105
2.2.2. <i>Leishmania spp.</i>	108
2.3. Les granulomes fongiques.....	110
2.3.1. <i>Histoplasma capsulatum</i>	110
2.3.2. <i>Cryptococcus neoformans</i>	112
3. Les granulomes à <i>Candida</i>.....	113
4. Les modèles d'étude de l'interaction hôte-<i>Candida</i>	119
Partie II Résultats expérimentaux.....	124
ARTICLE N°1	125
ARTICLE N°2	174
ARTICLE N°3	190
Partie III Conclusion générale et perspectives	204
Références bibliographiques.....	212

Liste des abréviations

AD-HIES : Autosomal-Dominant Hyper IgE Syndrome
ADCC : Antibody Dependant Cellular Cytotoxicity
ADN : Acide désoxyribonucléique
ALS : Agglutinin-like sequence
AMP : Anti-microbial peptide
APEDEC : Autoimmune PolyEndocrinopathy Candidiasis Ectodermal Dystrophy
ARN : Acide Ribonucléique
CDC : Candidose disséminée chronique
CLRs : C-type lectin receptors
CMC : Candidose cutanéomuqueuse chronique
CPA : Cellule présentatrice d'antigène
CR : Complement receptor
DAPI : Di Aminido Phenyl Indol
DC-SIGN : Dendritic-cell Specific ICAM3-grabbing non-integrin
DRF : Damage Response Framework
ECM : Extracellular matrix
ECMM : European Confederation of Medical Mycology
GFP : Green fluorescent protein
GPI : Glycosyl Phosphatidyl Inositol
HAART : Highly Active AntiRetroviral Therapy
HAG : Hypha-associated Gene
HLP : Haemolysin-like Protein
HWP : Hyphal Wall Protein
IFN : Interferon
Ig : Immunoglobuline
IL : Interleukine
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
ITS : Internal Transcribed Spacer
MALDI-TOF : Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time Of Flight
MEB : Microscope électronique à balayage
MPO : Myéloperoxydase
MTL : Mating Type Locus
NAC : non-albicans
NETs : Neutrophils extracellulars- traps
NK : Natural killer
NLRs : NOD-like receptors
OPC : Oro Pharyngeal Candidiasis
PAMPs : Pathogen associated molecular patterns
PCB : Pomme de terre, carotte, bile
PCR : Polymerase Chain Reaction
PL : Phospholipase

PLM : Phospholipomannane
PMSI : Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information
PNN : Polynucléaire neutrophile
PRRs : Pattern recognition receptors
QSM : Quorum sensing molecules
RAPD : Randomly Amplified Polymorphic DNA
RAT: Rice, agar, tween
RLRs : RIG-I-like receptors
RNS : Reactive nitrogen species
ROS : Reactive oxygen species
SAP : Secreted Aspartyl Protease
SIDA : Syndrome d'ImmunoDéficiency Acquis
SIRI : Syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire
STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF : Transforming growth factor
TLRs : Toll-like receptors
TNF : Tumor necrosis factor
TRANSNET : Transplant Associated Infection Surveillance Network
USI : Unité de soins intensifs
VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Table des figures

FIGURE 1 : MODE DE REPRODUCTION CHEZ <i>CANDIDA</i>	14
FIGURE 2 : POLYMORPHISME CHEZ <i>CANDIDA</i>	14
FIGURE 3 : CHLAMYDOSPORES CHEZ (A) <i>C. ALBICANS</i> ET (B) <i>C. DUBLINIENSIS</i>	15
FIGURE 4 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DES CLADES <i>CANDIDA</i> ET <i>SACCHAROMYCES</i>	17
FIGURE 5 : ARBRE PHYLOGENETIQUE DU GENRE <i>CANDIDA</i>	18
FIGURE 6 : CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES DE DES PRINCIPALES ESPECES DE <i>CANDIDA</i> D'INTERET MEDICAL.....	25
FIGURE 7 : ORGANISATION DE LA STRUCTURE DE LA PAROI DE <i>CANDIDA</i>	26
FIGURE 8 : CANDIDOSES CUTANEEES.	31
FIGURE 9 : LES CANDIDOSES URO-GENITALES.....	32
FIGURE 10 : LES CANDIDOSES DIGESTIVES.	33
FIGURE 11 : MANIFESTATIONS CLINIQUES DE CANDIDOSE CUTANEOMUQUEUSE CHRONIQUE (CMC).....	34
FIGURE 12 : FREQUENCES DES PRINCIPALES INFECTIONS FONGIQUES INVASIVES A TRAVERS LE MONDE.....	35
FIGURE 13 : IMAGE PAR RESONNANCE MAGNETIQUE (IRM) DU CERVEAU D'UN NOUVEAU-NE PREMATURE ATTEINT D'UNE CANDIDOSE NEUROMENINGEE.	37
FIGURE 14 : DIAGNOSTIC ET HISTOLOGIE DE CANDIDOSE DISSEMINEE CHRONIQUE (CDC)	38
FIGURE 15 : INFECTIONS FONGIQUES INVASIVES CHEZ 1063 RECEVEURS D'ORGANES SOLIDES.....	41
FIGURE 16 : CIBLES DES DIFFERENTES CLASSES D'ANTIFONGIQUES SYSTEMIQUES	46
FIGURE 17 : LES INTERACTIONS HOTE-PATHOGENES.	48
FIGURE 18 : DIAGRAMME SCHEMATIQUE DE LA STRUCTURE DES GENES ALS.....	52
FIGURE 19 : EXPRESSION DIFFERENTIELLE DES GENES SAP EN FONCTION DU STADE MORPHOLOGIQUE DE <i>C. ALBICANS</i>	54
FIGURE 20 : PRINCIPALES FORMES MORPHOLOGIQUES DE <i>CANDIDA</i>	56
FIGURE 21 : LE THIGMOTROPISME PERMET L'INVASION DE TISSUS PAR <i>C. ALBICANS</i>	58
FIGURE 22 : TRANSITION PHENOTYPIQUE ENTRE CELLULES « BLANCHES » ET « OPAQUES » CHEZ <i>C. ALBICANS</i>	59
FIGURE 23 : BIOFILM A <i>CANDIDA</i>	62
FIGURE 24 : STRUCTURE DE LA MOLECULE DE FARNESOL.....	63
FIGURE 25 : RECONNAISSANCE DE <i>CANDIDA</i> SPP. PAR LE SYSTEME IMMUNITAIRE.....	65
FIGURE 26 : INTERACTION ENTRE LES NEUTROPHILES ET <i>CANDIDA</i>	68
FIGURE 27 : INTERACTION DES MACROPHAGES AVEC <i>CANDIDA</i>	77
FIGURE 28 : INTERACTION DE CELLULES NK AVEC <i>CANDIDA</i>	80
FIGURE 29 : INTERACTION DES CELLULES DENDRITIQUES AVEC <i>CANDIDA</i>	83
FIGURE 30 : INTERACTION DES LYMPHOCYTES T AVEC <i>CANDIDA</i>	86
FIGURE 31 : LYMPHOCYTES B.....	90
FIGURE 32 : LES CELLULES SPECIFIQUES DU GRANULOME.....	96
FIGURE 33 : GRANULOMES GIGANTO-EPITHELIO-CELLULAIRES	97
FIGURE 34 : GRANULOME PALISSADIQUE	98
FIGURE 35 : GRANULOME PYO EPYTHELIOÏDE	99
FIGURE 36 : GRANULOME AVEC ANNEAU DE FIBRINE.....	99
FIGURE 37 : GRANULOME A CORPS ETRANGER	100
FIGURE 38 : LESION FIBROTIQUE RESIDUELLE.....	101
FIGURE 39 : GRANULOMES A <i>MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS</i>	103
FIGURE 40 : GRANULOME A <i>S. MANSONI</i>	106
FIGURE 41 : GRANULOMES A <i>LEISHMANIA</i>	109
FIGURE 42 : GRANULOME A <i>HISTOPLASMA CAPSULATUM</i>	111
FIGURE 43 : GRANULOME A <i>CRYPTOCOCCUS NEOFORMANS</i>	113
FIGURE 44 : DIAGNOSTIC ET HISTOLOGIE DU GRANULOME A <i>CANDIDA</i> DANS LE CADRE DE LA CMC.....	115
FIGURE 45 : DIAGNOSTIC ET HISTOLOGIE DU GRANULOME A <i>CANDIDA</i> DANS LE CADRE DE LA CANDIDOSE HEPATOSPLENIQUE	116
FIGURE 46 : HISTOLOGIE D'UN GRANULOME RENAL A <i>C. ALBICANS</i>	117
FIGURE 47 : DIAGNOSTIC ET HISTOLOGIE DES GRANULOMES CEREBRAUX A <i>CANDIDA</i>	118
FIGURE 48 : CINETIQUE DE FORMATION DU MODELE DE GRANULOME A <i>C. ALBICANS</i> <i>IN VITRO</i> PAR MICROSCOPIE ELECTRONIQUE A BALAYAGE.....	123
FIGURE 49 : DISTRIBUTION DES ESPECES DE <i>CANDIDA</i> RESPONSABLES DE CANDIDEMIES	127

Table des tableaux

TABLEAU 1 : FORMES TELEOMORPHES D'ESPECE DE <i>CANDIDA</i> IMPLIQUES DANS DES INFECTIONS.....	16
TABLEAU 2 : DISTINCTIONS PHENOTYPIQUES ET DE VIRULENCE ENTRE <i>C. ALBICANS</i> ET <i>C. DUBLINIENSIS</i> (PAUGAM ET AL. 2008).....	19
TABLEAU 3 : ESPECES DE <i>CANDIDA</i> ISOLEES EN PATHOLOGIE HUMAINE ET CLASSEES EN FONCTION DE LEUR FREQUENCE (JOHNSON 2009).....	21
TABLEAU 4 : PRINCIPAUX FACTEURS DE VIRULENCE CHEZ <i>CANDIDA</i> SPP.	51

Partie I

Analyse bibliographique

Chapitre I :
Caractéristiques générales du genre
Candida

1. Le genre *Candida*

1.1. Caractéristiques générales

Les champignons du genre *Candida* sont des organismes eucaryotes microscopiques, habituellement appelés « levures ». Il s'agit de champignons levuriformes polymorphes dont le mode de reproduction se fait par bourgeonnement (**Figure 1**).

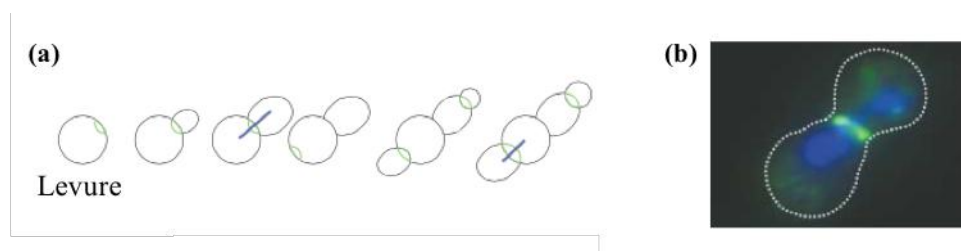


Figure 1 : Mode de reproduction chez *Candida*.

(a) Représentation schématique du bourgeonnement. (b) Photographie de microscopie à fluorescence d'une levure de *C. albicans* en cours de bourgeonnement. L'anneau de septine (septum) au niveau de la jonction entre cellule mère et cellule fille est marqué en vert (GFP), le noyau en bleu (DAPI) (Berman et Sudbery 2002)

Certaines espèces de *Candida* possèdent un polymorphisme leur permettant de se développer sous la forme de levures unicellulaires ou blastoconidies, mais aussi de produire des filaments sous la forme de pseudohyphes et /ou de hyphes vrais (Merseguel *et al.* 2015; Papon *et al.* 2013) (**Figure 2**).



Figure 2 : Polymorphisme chez *Candida*.

Observation microscopique de différentes structures morphologiques chez *C. albicans*, (a) blastoconidies de forme ovale bourgeonnante, (b) levures avec pseudohyphes et (c) hyphe vrai. Les barres représentent 10 μ m (Sudbery *et al.* 2004).

La transition de la forme levure aux formes filamenteuses et inversement, peut-être induite par différentes conditions environnementales. Le développement d'hyphes à partir de levures non bourgeonnantes est activé par l'addition de sérum, une température de croissance de 37°C, un pH neutre ainsi qu'une forte concentration en phosphate (supérieure à 600 mM). De même, une croissance à une température inférieure à 30°C ou à un pH de 4 active la transition vers la forme levure (Sudbery *et al.* 2004).

Les blastoconidies de forme ronde ou ovalaire, sont non capsulées, non pigmentées, diploïdes ou haploïdes et peuvent mesurer de 3 à 15 µm selon l'espèce, avec parfois un bourgeon en formation. Ces cellules poussent en conditions aérobiques à une température optimale de 37°C.

Les pseudohyphes sont composées d'une succession de cellules ressemblant à un filament mycélien. Chaque compartiment cellulaire est identique en longueur (500 et 600 µm de long et 3 à 5 µm de largeur), contient la même quantité de matériel génétique, mais diffère du précédent en quantité de cytoplasme et par ses constituants. Le pseudomycélium correspond à une masse de pseudohyphes.

Les hyphes vrais, correspondent à une forme filamenteuse cylindrique avec des bords parallèles. La conversion d'une levure en filament mycélien passe par l'intermédiaire d'une structure appelée tube germinatif. Cette forme spécifique favorise l'invasion des tissus et des organes de l'hôte. Le mycélium correspond à une masse d'hyphes. Les conditions optimales pour la filamentation de *C. albicans* sont un pH de 7 et une température de 37°C (Nadeem *et al.* 2013).

Dans des conditions pauvres en nutriments, *C. albicans* et *C. dubliniensis* peuvent former des chlamydozoïdes qui sont des structures sphériques réfringentes possédant une paroi épaisse, d'un diamètre d'environ 10 µm situées à l'extrémité des pseudohyphes (Palige *et al.* 2013) (**Figure 3**).

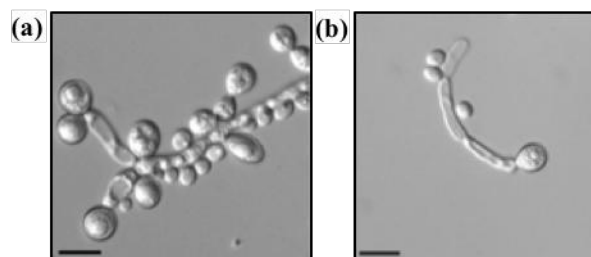


Figure 3 : Chlamydozoïdes chez (a) *C. albicans* et (b) *C. dubliniensis*.

Les barres représentent 10 µm (Palige *et al.* 2013).

1.2. Classification taxonomique du genre *Candida*

D'un point de vue historique, Hippocrate, initiateur de l'observation clinique, fait la description au 4^{ème} siècle avant J.C. de la pathologie dite du Muguet qui est une candidose buccale. Ce n'est qu'en 1847 que le lien entre le champignon *C. albicans*, alors nommé *Oidium albicans* et le muguet buccal est établi par le mycologue Charles-Philippe Robin. Et ce n'est qu'en 1923 que Berkhout replace cette espèce dans le genre *Candida* (Skinner 1947).

Certaines levures du genre *Candida* sont capables de reproduction sexuée. Ces formes sexuées (formes parfaites ou téléomorphes) portent un nom différent de celui de la forme asexuée (forme imparfaite ou anamorphe) (**Tableau 1**). Par exemple, *Clavispora lusitaniae* est le stade sexué de *Candida lusitaniae*. Toutefois cette classification reposant uniquement sur l'existence d'une forme sexuée est complexe et source de confusion. En mycologie médicale, pour les levures d'intérêt médical, étant donné que la forme sexuée est très rarement observée lorsqu'elle existe, il est usuel de nommer celles-ci par leur stade asexué (Bouchara 2010).

Tableau 1 : Formes téléomorphes d'espèce de *Candida* impliquées dans des infections invasives (Johnson 2009).

Forme asexuée ou anamorphe	Forme sexuée ou téléomorphe
<i>Candida famata</i>	<i>Debaryomyces hansenii</i>
<i>Candida guilliermondii</i>	<i>Pichia guilliermondii</i>
<i>Candida kefyr</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Candida krusei</i>	<i>Issatchenkia orientalis</i>
<i>Candida lipolytica</i>	<i>Yarrowia lipolytica</i>
<i>Candida lusitaniae</i>	<i>Clavispora lusitaniae</i>
<i>Candida norvegensis</i>	<i>Pichia norvegensis</i>
<i>Candida pelliculosa</i>	<i>Pichia anomala</i>
<i>Candida pintolopesii</i>	<i>Kazachstania pintolopesii</i>
<i>Candida utilis</i>	<i>Pichia jadinii</i>
<i>Candida valida</i>	<i>Pichia membranifaciens</i>

D'un point de vue taxonomique les *Candida* appartiennent au Phylum *Ascomycota*, au sous-Phylum *Saccharomycotina*, à la Classe des *Saccharomycetes* (*Hemiascomycetes*), à l'Ordre *Saccharomycetales* et à la Famille *Saccharomycetaceae*, expliquant la proximité avec le genre *Saccharomyces* (Hibbett *et al.* 2007) (**Figure 4**).

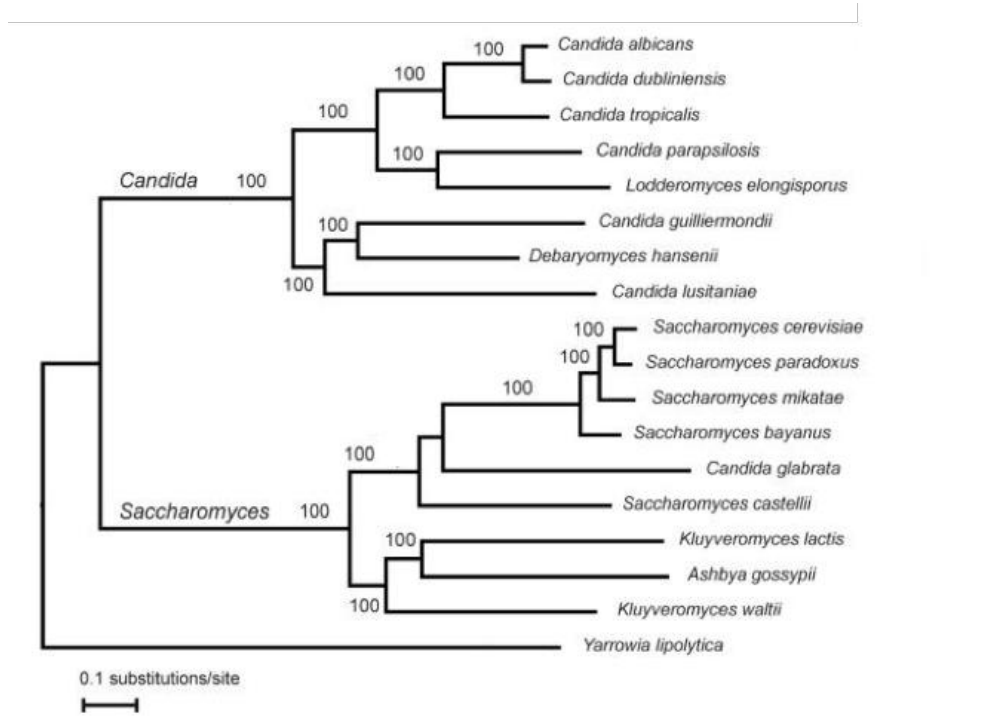


Figure 4 : Arbre phylogénétique des clades *Candida* et *Saccharomyces*.

(Butler *et al.* 2009)

Certaines espèces du genre *Candida* font partie de complexes d'espèces cryptiques. Un complexe d'espèce se compose d'espèces proches aux niveaux phénotypiques et phylogéniques mais qui présentent tout de même suffisamment de différences génétiques pour être considérées comme espèces distinctes (**Figure 5**). C'est le cas du complexe *C. albicans* et *C. dubliniensis*. En effet, l'espèce *C. dubliniensis* a été décrite la première fois en 1995 à Dublin par Sullivan *et al.* qui avaient remarqué que certaines souches de *C. albicans* isolées de candidoses buccales de patients infectés par le VIH, se comportaient de façon atypique, présentant un nombre de chlamydospores anormalement élevé dans les cultures *in vitro*. De plus, ces souches présentaient un profil génétique identique entre elles mais distinct des souches habituelles de *C. albicans* (Sullivan *et al.* 1995). *C. dubliniensis* existait antérieurement à sa mise en évidence dans les années 1990, mais les isolats étaient identifiés comme « *C. albicans* », du fait de leur grande ressemblance phénotypique (Meis *et al.* 1999). Une fois les deux espèces identifiées, des différences phénotypiques ont été mises en

évidence. Les principales sont la croissance à 42°C possible pour *C. albicans* et non pour *C. dubliniensis*, plus rapide et avec une filamentation et une formation de biofilm plus importante pour *C. albicans* (**Tableau 2**).

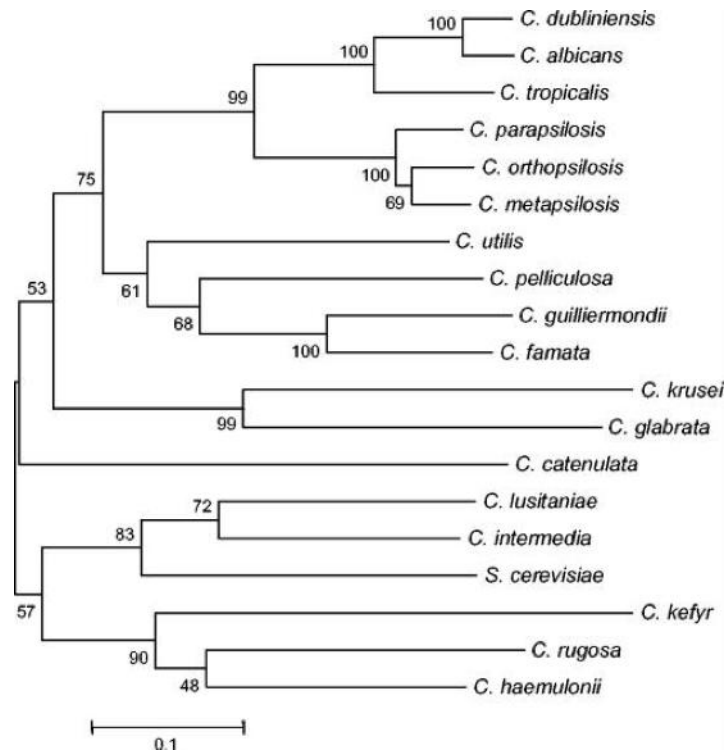


Figure 5 : Arbre phylogénétique du genre *Candida*.

Obtenu après analyse comparative des séquences nucléotidiques de la région ITS1 (International Transcribed Spacer) de l'ADN ribosomal (Tavanti *et al.* 2005).

Tableau 2 : Distinctions phénotypiques et de virulence entre *C. albicans* et *C. dubliniensis* (Paugam *et al.* 2008).

	<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>
<i>Chlamydozoospores</i>	+ isolées	+++ groupées
<i>Croissance</i>		
42°C	+	-
Sabouraud + 6,5 % NaCl	+	-
<i>Assimilation</i>		
Glycérol	+	-
D-xylose	+	-
Présence de β -glucosidase	oui	non
<i>Croissance</i>	Plus rapide	Plus lente
<i>Filamentation</i>	+++	+
<i>Phospholipase</i>	oui	non
<i>Aspartyl protéinase</i>	+++	+
<i>Biofilm</i>	+++	+

C. parapsilosis a longtemps été considérée comme une espèce hétérogène composée de trois groupes, nommés *C. parapsilosis* groupes I, II et III. Cette différenciation reposait sur des techniques moléculaires telles que le RAPD (Randomly Amplified Polymorphic DNA) et le séquençage des ADN ribosomiaux et mitochondriaux (Nosek *et al.* 2002; Lin *et al.* 1995). Une étude approfondie des séquences ADN des trois groupes de *C. parapsilosis* a été réalisée suite au séquençage des régions D1/D2 et ITS de l'ADN ribosomal. Cette étude a permis de mettre en évidence des différences génétiques assez importantes pour pouvoir séparer les groupes en 3 espèces distinctes (Tavanti *et al.* 2005) :

- le groupe I est devenu *C. parapsilosis* au sens strict
- le groupe II est devenu *C. orthopsilosis*
- le groupe III est devenu *C. metapsilosis*.

Ces trois espèces sont donc regroupées sous le terme de complexe d'espèces *C. parapsilosis*. D'un point de vue épidémiologique, il a été montré que la proportion de chacune des espèces de ce complexe varie en fonction de la géographie bien que dans tous les cas, *C. parapsilosis* reste l'espèce principale isolée chez l'Homme (Lockhart *et al.* 2008).

Tout comme pour le complexe *C. parapsilosis*, il en a été de même pour *C. glabrata*. Deux nouvelles espèces confondues auparavant ont été récemment décrites : *C. nivariensis* en

2005 et *C. bracarensis* en 2006 (Correia *et al.* 2006; Alcoba-Florez *et al.* 2005). Pour ce qui est de leur prévalence, il semble que celle-ci soit faible (Cuenca-Estrella *et al.* 2011; Lockhart *et al.* 2009).

1.3. Principales espèces de *Candida* d'intérêt médical

Les levures du genre *Candida* sont ubiquitaires, présentes dans une grande diversité d'environnements et au niveau de nombreuses matières organiques végétales ou animales (air, fruits, sol, produits alimentaires, produits laitiers, céréales, viandes, ...) (ANOFEL 2013; Odds 2001). Ces microorganismes sont également des saprophytes de l'Homme présents au niveau de la flore microbienne commensale du tube digestif et de la flore cutanée, où ils sont en équilibre avec la flore bactérienne. En effet, chez environ 50% de la population, *Candida* est présent au niveau du tractus gastro-intestinal et génital de manière asymptomatique (Pankhurst 2009; Pfaller et Diekema 2007). Toutefois, ces levures commensales peuvent devenir pathogènes opportunistes et provoquer des candidoses chez les patients immunodéprimés, mais aussi suite à une chimiothérapie prolongée et/ou à des interventions chirurgicales répétées (Bassetti *et al.* 2013; Brown *et al.* 2012).

Le genre *Candida* est composé d'espèces de type haploïde ou diploïde et dont certaines sont capables de reproduction sexuée. De nombreux génomes du genre sont séquencés et leur taille varie entre 10 Mb (*C. guilliermondii*) et 14,5 Mb (*C. tropicalis*). De plus, *Candida* sp. a comme particularité génétique de traduire le codon CUG en sérine plutôt qu'en leucine (Butler *et al.* 2009). Le genre *Candida* regroupe au moins 200 espèces différentes dont environ 40 d'entre elles ont été décrites comme potentiellement à l'origine d'infections humaines et seulement 15 espèces ont été reconnues pour causer des infections invasives (Yapar 2014; Johnson 2009) (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Espèces de *Candida* isolées en pathologie humaine et classées en fonction de leur fréquence (Johnson 2009).

Espèces fréquentes	Espèces peu fréquentes	Espèces rares	
<i>C. albicans</i>	<i>C. dubliniensis</i>	<i>C. blankii</i>	<i>C. membranaefaciens</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>C. famata</i>	<i>C. bracarensis</i>	<i>C. nivariensis</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>C. inconspicua</i>	<i>C. catenulata</i>	<i>C. palmioleophila</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. lipolytica</i>	<i>C. chiropteroorum</i>	<i>C. pararugosa</i>
<i>C. krusei</i>	<i>C. metapsilosis</i>	<i>C. ciferri</i>	<i>C. pseudohaemulonii</i>
<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. norvegensis</i>	<i>C. eremoplila</i>	<i>C. pseudorugosa</i>
<i>C. lusitaniae</i>	<i>C. orthopsilosis</i>	<i>C. fabianii</i>	<i>C. pintolopesii</i>
<i>C. kefyr</i>	<i>C. pelliculosa</i>	<i>C. fermentati</i>	<i>C. pulcherrima</i>
	<i>C. rugosa</i>	<i>C. freyschussii</i>	<i>C. thermophila</i>
	<i>C. zeylanoides</i>	<i>C. haemulonii</i>	<i>C. utilis</i>
		<i>C. intermedia</i>	<i>C. valida</i>
		<i>C. lambica</i>	<i>C. viswanathii</i>
		<i>C. magnoliae</i>	

Bien que regroupées au sein du même genre, les différentes espèces de *Candida* d'intérêt médical présentent des caractéristiques qui leur sont propres.

Candida albicans

C. albicans est une levure diploïde possédant deux paires de 8 chromosomes. Son génome a été séquencé et est disponible sur <http://www.candidagenome.org/>. La forme sexuée a été décrite, cependant les conditions optimales pour la conjugaison n'ont jusqu'ici jamais été reproduites en laboratoire. *C. albicans* produit des colonies blanches, luisantes et lisses à bords nets sur milieu Sabouraud (Bouchara 2010). En microscopie, les blastoconidies sont de forme ovoïde, de 3 à 14 µm de long et 3 à 7 µm de large (**Figure 6a**). Cette espèce est également capable de former des pseudohyphes et hyphes vrais, ainsi que des chlamydospores sur milieu RAT (crème de riz, agar, Tween 80). *C. albicans* est un commensal de l'Homme que l'on retrouve notamment au niveau de la muqueuse du tube digestif mais aussi au niveau de muqueuses génito-urinaires. Il est également présent au niveau de la flore intestinale de nombreux mammifères et oiseaux. Dans ce cas, *C. albicans* est en équilibre avec la flore bactérienne locale. Toutefois, cette espèce n'est pas retrouvée au niveau de la flore cutanée

d'un individu sain, mais peut se développer sur un épithélium lésé (Bouchara 2010). En clinique, *C. albicans* est habituellement retrouvée lors d'infections cutanées ou muqueuses (infections buccales, oropharyngées et vaginales), mais aussi lors d'infections profondes (péritonites, endocardites) et disséminées (candidémies, atteintes hépato-spléniques). *C. albicans* est l'espèce majoritairement isolée dans les cas de candidémies (plus de 50% des isolats) (Tadec *et al.* 2016; Bitar *et al.* 2013).

Candida parapsilosis

C. parapsilosis est diploïde et possède 14 chromosomes. Elle forme des colonies couleur crème, luisantes et lisses ou irrégulières sur milieu Sabouraud et les blastoconidies sont de forme ovoïde ou ronde, de 3 à 7 µm de long et 3 à 4 µm de large (Bouchara 2010) (**Figure 6b**). Cette espèce est également capable de former des pseudohyphes assez courts. *C. parapsilosis* est une levure commensale de la peau et parfois du tube digestif chez l'Homme. Elle supporte assez bien les conditions environnementales étant ainsi isolée à partir de céréales et de produits laitiers. Au niveau cutané, elle peut être parfois à l'origine de lésions, notamment d'onyxis. En clinique, elle peut être à l'origine de candidémies et d'infections profondes (endocardites, péritonites), notamment chez les nouveau-nés et les enfants, en raison de sa capacité à adhérer à des matériaux synthétiques (cathéters centraux et autres dispositifs de perfusion pour solutés de nutrition parentérale).

Candida glabrata

C. glabrata est une levure haploïde possédant 13 chromosomes (génomme disponible sur <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomeprj/>). C'est une levure commensale des voies digestives et génito-urinaires de l'Homme, rarement isolée dans le milieu extérieur. Elle a vu son incidence augmentée ces dernières années en raison de la pression des antifongiques azolés et sa sensibilité dose-dépendante à ces molécules. *C. glabrata* se caractérise par des colonies blanches, lisses et luisantes sur Sabouraud et par des levures de petite taille, rondes à ovoïdes (3 à 4 µm de long et 2 à 3 µm de large) en microscopie (Bouchara 2010) (**Figure 6c**). Elle est capable de former des pseudohyphes mais pas d'hyphes vrais (Thompson *et al.* 2011). *C. glabrata* peut être responsable d'infections digestives et du tractus urinaire (vaginites) mais aussi de candidémies et de candidoses systémiques notamment chez les patients hospitalisés en oncologie et en Unités de Soins Intensifs (USI) (Glockner et Cornely 2015; Rodrigues *et al.* 2014).

Candida tropicalis

C. tropicalis est une levure diploïde (10-12 chromosomes) ou haploïde. C'est un saprophyte de l'environnement retrouvé dans l'eau, le sol, l'air, les céréales mais aussi chez certains mammifères. Chez l'Homme on la retrouve comme commensal au niveau de la peau et des muqueuses digestives et urinaires. Sur milieu Sabouraud, *C. tropicalis* forme des colonies de couleur crème, luisantes et plissées et les blastoconidies sont de forme ovale et assez volumineuses (6 à 10 µm de long et 4 à 7 µm de large) (Bouchara 2010)(**Figure 6d**). Cette espèce est aussi capable de former des hyphes et de nombreux pseudohyphes assez longs et peu ramifiés (Thompson *et al.* 2011). En clinique, *C. tropicalis* est à l'origine de candidémies et candidoses systémiques chez des patients immunodéprimés, notamment en onco-hématologie, chez les patients neutropéniques et les greffés de moelle osseuse. On la retrouve plus fréquemment chez l'adulte que chez l'enfant.

Candida krusei

C. krusei est un saprophyte de l'environnement (sol, eau, air) également très présent dans les produits laitiers et les fruits mais aussi le vin et la bière. Chez l'Homme, c'est une levure commensale à colonisation transitoire des voies digestives, respiratoires et urogénitales (Bouchara 2010). *C. krusei* se caractérise par des colonies blanches et mates, plates et sèches à bords festonnés sur milieu Sabouraud. En microscopie, les levures sont de forme cylindrique à ovale de 5 à 12 µm de long et 3 à 6 µm de large, et l'on peut noter la présence de pseudohyphes (**Figure 6e**). Cette espèce est à l'origine de candidémies et émerge de façon sporadique notamment chez les patients cancéreux neutropéniques. *C. krusei* serait aussi à l'origine de diarrhées chez le nouveau-né, mais aussi d'endocardites et plus rarement d'infections urinaires. Il est important de noter sa résistance naturelle au fluconazole.

Candida kefyr

C. kefyr est une espèce provenant des produits laitiers fermentés (fromages, yaourts) et est considérée comme commensale de la peau et des muqueuses respiratoires et digestives chez l'Homme. Elle présente également une résistance variable au fluconazole. Sur milieu Sabouraud, cette espèce se caractérise par des colonies crémeuses de couleur blanche à crème et translucides. Les blastoconidies sont de forme allongée ou ovoïde (de 7-10 µm de long sur 3-5 µm de large) avec parfois un pseudohyphe abondant (**Figure 6f**). En clinique, *C. kefyr* est responsable de candidémies mais aussi de candidoses profondes ou systémiques.

Candida lusitaniae

Cette espèce est retrouvée à l'état commensal au niveau du tube digestif de l'Homme, mais aussi chez de nombreux mammifères et oiseaux. Elle forme des colonies blanches-crèmes, lisses et brillantes sur milieu de culture et les levures sont de petite taille (3-6 µm de long à 2-4 µm de large) de forme ovale avec des pseudohyphes courts (**Figure 6g**). *C. lusitaniae* est principalement retrouvée comme impliquée dans des candidémies et des infections disséminées. Elle est considérée comme une levure émergente, notamment chez les patients immunodéprimés (leucémies, cancers, greffe de moelle osseuse) ou hospitalisés en USI où elle peut être à l'origine de petites épidémies nosocomiales. De nombreux isolats cliniques présentent une résistance innée à l'amphotéricine B.

Candida guilliermondii

C. guilliermondii est une levure haploïde issue du milieu extérieur où elle est assez répandue. Chez l'Homme, on la retrouve à l'état commensale au niveau de la peau et des muqueuses (principalement digestives). Sur milieu Sabouraud, elle forme de petites colonies lisses de couleur blanches ou crèmes. *C. guilliermondii* produit des blastospores de petite taille et ovales (3-6 µm de long sur 2-4 µm de large) et peut former un pseudomycélium rudimentaire (**Figure 6h**). Elle provoque des infections superficielles (intertrigo et onyxis) et des candidémies principalement chez les patients sévèrement immunodéprimés.

Candida dubliniensis

Longtemps confondue avec *C. albicans*, cette levure est principalement isolée de la muqueuse oro-pharyngée humaine et est apparue en pathologie humaine avec l'émergence du SIDA où elle est fréquemment isolée. *C. dubliniensis* produit des colonies blanches à bords nets, luisantes et lisses sur milieu Sabouraud, et tout comme *C. albicans* présente des blastoconidies de forme ovales (**Figure 6i**). Cette espèce est également capable de former des pseudohyphes et hyphes vrais, ainsi que des chlamydo-spores plus nombreuses que *C. albicans* (Bouchara 2010). Bien que moins fréquente que les espèces précédentes, *C. dubliniensis* de par sa filamentation et ses autres facteurs de virulence est une espèce pathogène vraie et est également impliquée dans des candidémies.

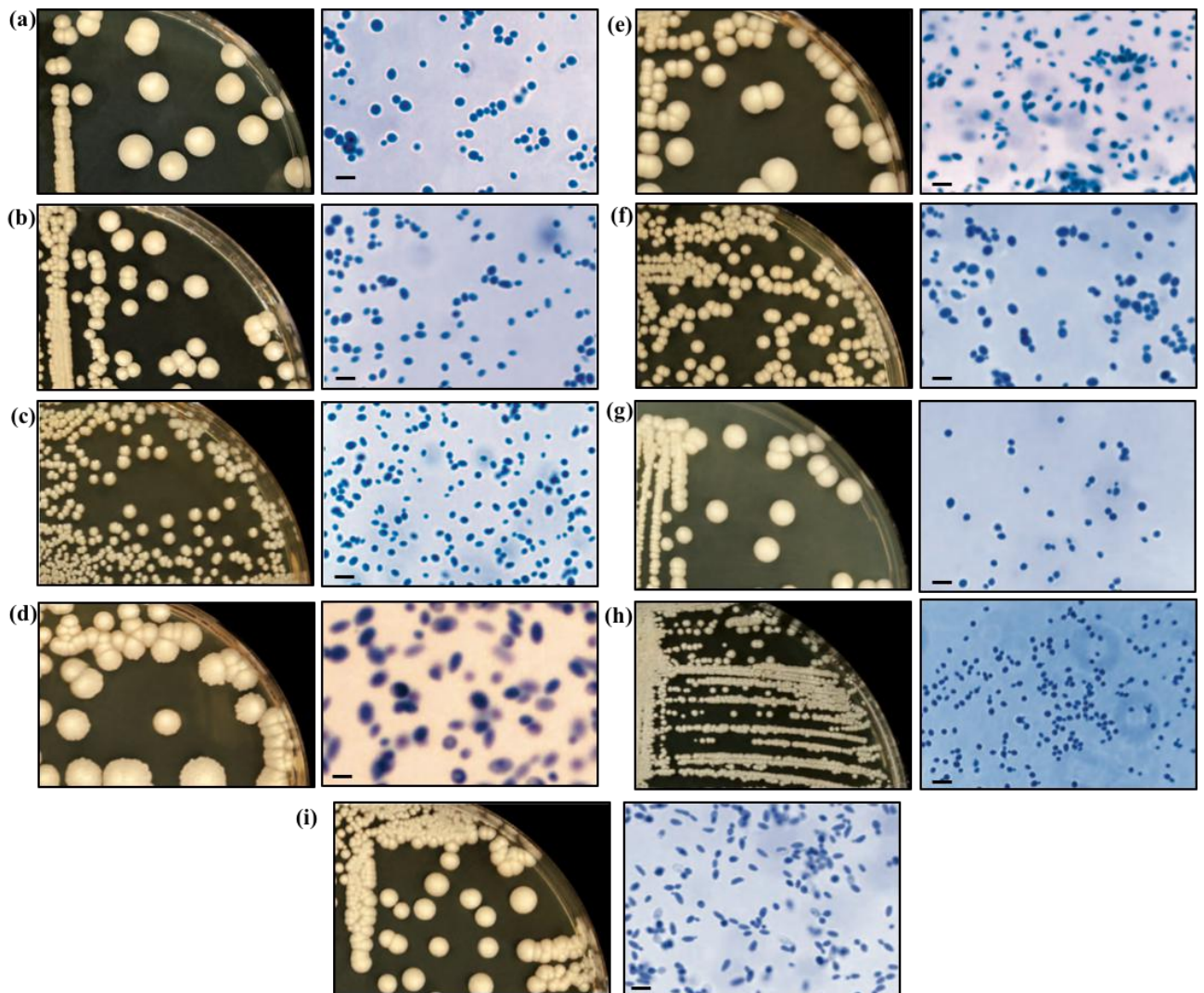


Figure 6 : Caractéristiques morphologiques de des principales espèces de *Candida* d'intérêt médical.

(a) *C. albicans*, (b) *C. parapsilosis*, (c) *C. glabrata*, (d) *C. tropicalis*, (e) *C. krusei*, (f) *C. kefyr*, (g) *C. lusitaniae*, (h) *C. guilliermondii* et (i) *C. dubliniensis*. Pour chaque espèce est présentée une photographie de l'aspect macroscopique de cultures sur gélose de Sabouraud et microscopique après coloration au bleu de lactophénol (x40). Les barres représentent 10 μ m.

1.4 Paroi fongique et ses principaux constituants :

Les levures du genre *Candida* sont constituées d'une paroi entourant la membrane. Celle-ci joue un rôle important notamment dans le maintien de l'intégrité cellulaire ainsi que dans le processus d'adhésion ; sa structure et sa composition sont donc très régulées. Elle est constituée d'une grande quantité de polysaccharides couplés à des lipides et des protéines. La

membrane quant à elle est principalement constituée d'ergostérol et non de cholestérol comme chez les mammifères ou les bactéries. L'ergostérol joue un rôle important dans de nombreux processus cellulaires mais contribue aussi au maintien de l'intégrité membranaire par protection contre les variations de pression osmotique, les attaques physico-chimiques de l'environnement et les changements de source de carbone (Brown *et al.* 2014a).

Les principaux constituants de la paroi fongique sont des polysaccharides : β -1,3 et β -1,6-glucanes, chitine et mannanes, ainsi que des mannoprotéines. Celle-ci est composée d'éléments de structure et d'une matrice qui permettent le maintien de la balance entre plasticité et résistance (**Figure 7**).

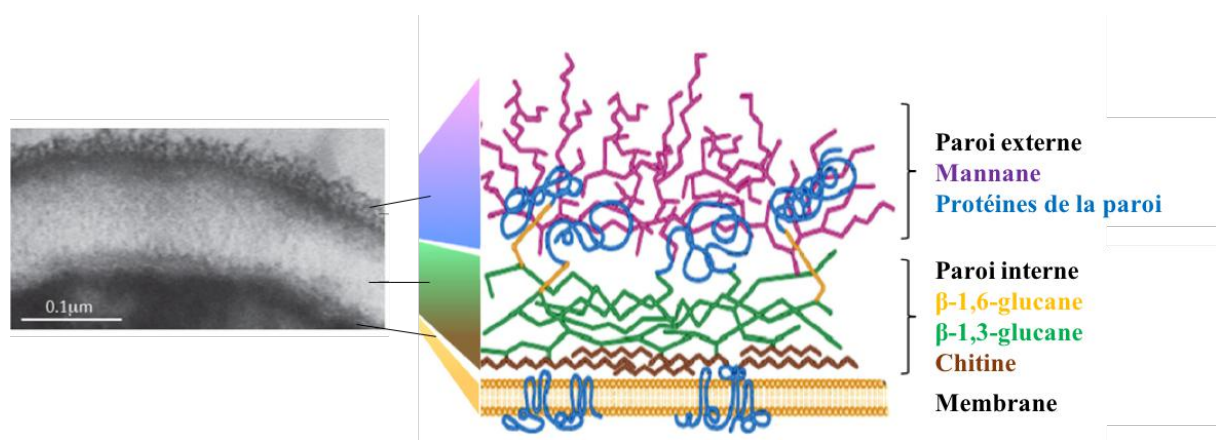


Figure 7 : Organisation de la structure de la paroi de *Candida*.

(Gow *et al.* 2011)

Le mannane

Le mannane est un composant important de la matrice de la paroi où il représente environ 40% des polysaccharides. C'est un polymère de mannose lié à des protéines par des liaisons covalentes (glycomanno-protéines). Le terme « mannane » fait également référence au principal composant immunogène et soluble présent dans la couche externe de la paroi, appelé phosphomannoprotéine ou aussi phosphopeptidomannane.

Les protéines pariétales

Les protéines pariétales constituent 6 à 25 % de la paroi et jouent un rôle important dans la structure de la matrice. Ces protéines peuvent être structurales, enzymatiques ou jouer un rôle dans les interactions cellulaires. Certaines participent au maintien du squelette cellulaire par association avec la chitine et les β -glucanes. Chez *Candida*, la classe de

protéines la plus représentée quantitativement est celle des protéines à ancras GPI (GlycosylPhosphatidyInositol) qui correspondent à 90% des protéines de la paroi et qui sont liées de manière covalente aux β -glucanes et à la chitine suite à une réaction de concaténation. L'expression des protéines pariétales est extrêmement régulée notamment lors de la transition levure-hyphes (Netea *et al.* 2008).

Les glucanes

Ce sont les constituants majeurs du squelette pariétal (60% du poids sec de la paroi) et ils permettent la résistance mécanique et chimique de la paroi (Gow *et al.* 2011). Le β -1,3-glucane, forme de longues chaînes de glucoses liés en β -1,3 avec pour certaines des ramifications latérales en β -1,6. En formant un squelette rigide, les β -glucanes confèrent une forte résistance à la levure mais jouent aussi un rôle dans l'adaptation de la cellule aux variations de son environnement.

Les lipides pariétaux

Retrouvés en faible proportion au niveau de la paroi (1 à 7%), les lipides participent à la rigidité de la paroi. Les principaux lipides sont représentés par des triglycérides, des phospholipides et des stérols (libres ou estérifiés). Un glycolipide intéressant a été identifié au niveau de la paroi de *C. albicans* : le phospholipomannane (PLM). Sa structure varie en fonction des conditions de pH et de température mais aussi en fonction de l'isolat clinique (Trinel *et al.* 2005). Celui-ci peut être sécrété à la surface de la paroi afin de se fixer aux cellules hôtes mais peut également induire l'apoptose chez les macrophages (Jouault *et al.* 2003). De plus, le PLM est un fort stimulus inflammatoire qui déclenche la production de cytokines inflammatoires (IL-6 notamment) par les macrophages (Jouault *et al.* 2003) mais aussi chez d'autres cellules (Li *et al.* 2009). Il a aussi été récemment démontré que le PLM joue un rôle crucial dans l'activation des macrophages (Fradin *et al.* 2015; Devillers *et al.* 2013).

La chitine

La chitine se présente sous la forme de polymères de N-acétylglucosamine (plus de 2000 résidus) reliés par liaisons β -1,4. Les chaînes de chitines sont reliées entre elles par des ponts hydrogène pour former un réseau tridimensionnel de microfibrilles au-dessus de la membrane dans la couche la plus profonde de la paroi (Ruiz-Herrera *et al.* 2006). Ce réseau microfibrillaire participe à la rigidité de la paroi par formation de complexes avec les β -

glucanes (Cabib *et al.* 2008). La chitine est également importante lors du bourgeonnement des levures, notamment lors de la formation de l'anneau de constriction pendant la séparation cellule mère / cellule fille (Gow *et al.* 2011). Malgré son rôle majeur, c'est un constituant mineur de la paroi (environ 2% du poids sec) à la distribution hétérogène au sein du squelette pariétal et variable au cours du cycle cellulaire mais aussi en fonction des conditions externes du milieu (Watanabe *et al.* 2005).

Chapitre II : Les candidoses

Les candidoses sont des affections fongiques opportunistes qui se développent dès lors que les barrières naturelles de l'organisme se retrouvent affaiblies ou endommagées. L'émergence des pathologies dites opportunistes a été favorisée par l'apparition du SIDA consécutive à l'infection par le VIH, l'augmentation du nombre d'interventions chirurgicales et de leur complexité mais aussi par les nouvelles thérapies immunosuppressives.

L'extrême variabilité biologique du genre *Candida* est reflétée par une large variabilité de manifestations cliniques. Toutefois, de façon schématique, les infections à *Candida* peuvent être de deux types ayant des pronostics très différents. D'un côté, les infections superficielles sont les plus fréquentes mais la plupart des formes cliniques n'engagent pas directement le pronostic vital ; et de l'autre, les infections profondes, qui présentent une morbidité et une mortalité élevées et survenant en général sur des terrains particuliers (maladies sous-jacentes, immunosuppression, etc.). La gravité des manifestations cliniques des candidoses varie en fonction de leur localisation, du terrain sur lequel elles évoluent mais aussi de l'espèce mise en cause.

1. Les candidoses superficielles

Les candidoses superficielles sont les manifestations cliniques les plus fréquentes. Souvent bénignes, elles sont toutefois très variées et peuvent toucher la peau, les phanères et les muqueuses mais aucun organe profond, et ce aussi bien chez les individus immunocompétents qu'immunodéprimés (Bouchara 2010; Sobel 2007).

1.1. Les candidoses cutanées et unguéales

Ces candidoses provoquent des infections au niveau des grands plis (plis de l'aîne et pli inter-fessier) et sont appelées intertrigo des grands plis. Il existe également l'intertrigo des petits plis qui concerne les plis interdigitaux palmaires (**Figure 8a**) et plus rarement les plis interdigitaux plantaires. Les onychomycoses à *Candida* sont caractérisées par des onyxis qui siègent préférentiellement aux niveaux des mains. Ces derniers sont associés à une réaction inflammatoire de la sertissure de l'ongle appelée périonixys (**Figure 8b**).

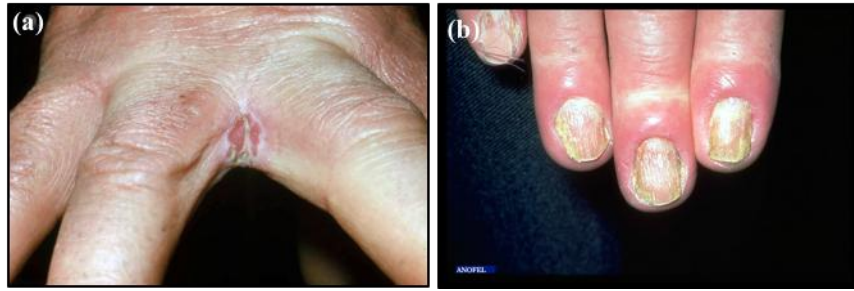


Figure 8 : Candidoses cutanées.

(a) Intertrigo interdigitale à *Candida* et (b) Candidose unguéale avec périonyxis inflammatoire (<http://www.eanofel.fr>)

L'apparition de ces affections est favorisée par l'humidité et la macération. Ces formes cliniques, le plus souvent bénignes, se traitent facilement en éliminant les facteurs favorisant et par mise en place d'un traitement antifongique le plus souvent local (Dias *et al.* 2013; Heald *et al.* 2001).

1.2. Les candidoses des muqueuses

1.2.1. Les candidoses uro-génitales

Les candidoses uro-génitales représentent les manifestations les plus fréquentes des candidoses touchant les muqueuses. Les candidoses vulvo-vaginales sont fréquentes chez les femmes. L'atteinte génitale chez l'Homme connue sous le nom de balanite mycosique est plus rare (**Figure 9a**). Les hommes ne sont pas porteurs sains de la levure au niveau génital et le développement de ces symptômes est plutôt secondaire à une contamination sexuelle (Lisboa *et al.* 2010). En effet, les femmes en âge de procréer et les femmes enceintes sont particulièrement exposées à ce type d'infection et il est estimé que 75% des femmes feront un épisode de candidose vulvo-vaginale au cours de leur vie (Sobel 2007) (**Figure 9b**). Les candidoses vulvo-vaginales chroniques ou récurrentes affectent entre 5 à 10% de femmes (Fidel 2005). Les principales espèces en cause sont *C. albicans* et *C. glabrata* mais on retrouve également *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* (Achkar et Fries 2010) avec des différences en fonction de la géographie (Goncalves *et al.* 2016).

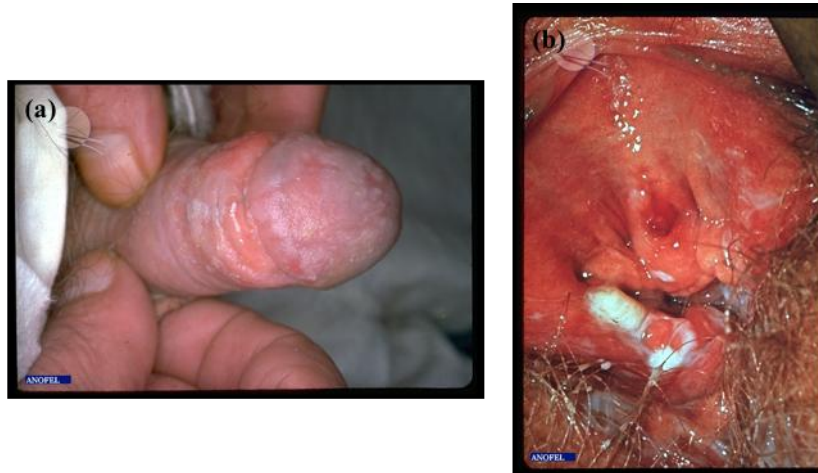


Figure 9 : Les candidoses uro-génitales.

(a) Balanite aiguë à *Candida* et **(b)** candidose vulvo-vaginale (<http://www.eanofel.fr>).

On peut également observer des cystites candidosiques et ce principalement chez des patients diabétiques ainsi que sur des porteurs de sonde vésicale. Celles-ci s'accompagnent d'une inflammation du méat urinaire et d'une urétrite (Achkar et Fries 2010).

1.2.2. Les candidoses digestives

Les candidoses des muqueuses digestives sont également très fréquentes étant donné le caractère commensal de différentes espèces de *Candida* au niveau du tractus digestif et peuvent affecter tous les segments du tube digestif. Les candidoses buccales concernent aussi bien les sujets immunocompétents que immunodéprimés et sont particulièrement fréquentes aux âges extrêmes de la vie (enfant de moins de 18 ans et sujet âgé). Chez les enfants, il y aurait une importance de l'immaturation du système immunitaire et un développement incomplet de flore buccale et chez les personnes âgées, la fréquence du port de prothèses dentaires (ANOFEL 2013). *C. albicans* est l'espèce la plus couramment retrouvée mais on peut également retrouver *C. tropicalis* et *C. glabrata* (Coronado-Castellote et Jimenez-Soriano 2013). Il existe 3 formes cliniques :

- La forme pseudomembraneuse ou muguet (la plus classique) : la muqueuse buccale (gencives, palais) et la langue sont recouvertes d'un enduit blanchâtre qui, quand il se détache, révèle une muqueuse rouge et saignante.
- La forme érythémateuse : dans cette forme clinique, les muqueuses buccales sont rouges, inflammatoires, lisses et vernissées sans plaques blanchâtres. La langue est rouge et décapillée.

- La candidose hyperplasique ou pseudo tumorale : présence de plaques blanc-jaunâtre au niveau de la muqueuse jugale et de la langue.

Les candidoses oropharyngées (OPC : oropharyngeal candidiasis) sont également très courantes chez les patients VIH (Martins *et al.* 2014) (**Figure 10a**). Toutefois depuis l'introduction des multi thérapies antirétrovirales (HAART : Highly Active AntiRetroviral Therapy), l'incidence des candidoses oropharyngées chez les patients VIH a significativement diminué, tandis qu'une augmentation est observée chez les patients transplantés (Patuwo *et al.* 2015). *C. albicans* et *C. glabrata* sont les deux espèces les plus couramment rencontrées au niveau buccal, on peut toutefois noter une augmentation de la prévalence de *C. dubliniensis* chez les patients atteints du VIH (Hanna *et al.* 2007; Sullivan *et al.* 1995).

La candidose œsophagienne a vu son incidence augmenter avec le SIDA et est souvent associée à une candidose oropharyngée non traitée. L'examen endoscopique révèle des plaques membraneuses épaisses (**Figure 10b**). Il est à noter que les *Candida* sont les principaux agents responsables d'œsophagites infectieuses.

Les candidoses digestives peuvent aussi se manifester au niveau de l'estomac et jusqu'à l'anus.

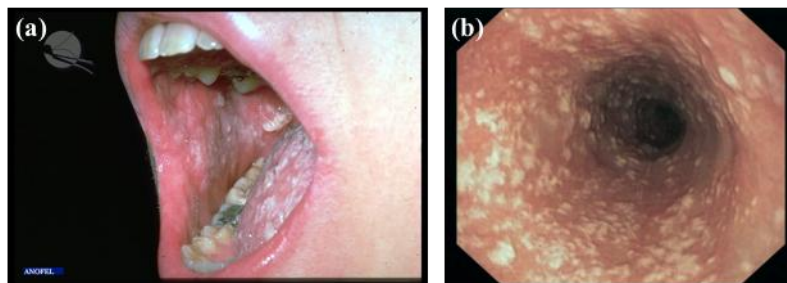


Figure 10 : Les candidoses digestives.

(a) Aspect clinique d'une candidose buccale chez un patient immunodéprimé. Forme pseudomembraneuse (<http://www.eanofel.fr>) (b) Candidose œsophagienne chez un patient infecté par le VIH (endoscopie) (Bouchara 2010).

1.3. Les candidoses cutanéomuqueuses chroniques

La candidose cutanéomuqueuse chronique (CMC) est une affection plus rare qui se caractérise par une persistance des infections superficielles de la peau, des ongles, des muqueuses buccales et génitales, accompagnée d'une incapacité de l'immunité cellulaire à éradiquer l'infection à *Candida* (**Figure 11**). Cette dernière touche principalement des familles dont les parents et/ou les enfants sont atteints de déficits immunitaires héréditaires

entraînant des défauts de l'immunité cellulaire (Soltesz *et al.* 2015; Puel *et al.* 2012; Puel *et al.* 2011). La CMC est notamment retrouvée chez des patients atteints du syndrome d'hyper IgE autosomique dominant (AD-HIES) causé par une mutation de *STAT1* et *STAT3* (signal transducer and activator of transcription) (van de Veerdonk *et al.* 2011) ou par une mutation de *CARD9* (Puel *et al.* 2012). On la retrouve aussi chez des personnes atteintes du syndrome de polyendocrinopathie auto-immune candidose dystrophie ectodermique (APEDEC) (Liu *et al.* 2011). Dans tous les cas, on observe une faible production d'IFN- γ , d'IL-17 et d'IL-22, ce qui provoque une réponse immune Th1 et Th17 diminuée et une incapacité à contrôler les infections à *Candida*.



Figure 11 : Manifestations cliniques de candidose cutanéomuqueuse chronique (CMC).

Patients issus d'une même famille présentant une CMC autosomale dominante (van de Veerdonk *et al.* 2011).

2. Les candidoses invasives ou profondes

Les candidoses invasives comprennent les candidémies, aussi appelées septicémies à *Candida*, mais aussi les atteintes viscérales profondes au niveau d'un ou de plusieurs sites non contigus, impliquant une dissémination hémotogène, soit à partir d'un foyer exogène (dispositifs médicaux, cathéters, implants, alimentation parentérale) ou d'un foyer digestif (chirurgie, thérapie anticancéreuse) (ANOFEL 2013). Ces affections peuvent être aiguës ou chroniques. Les infections invasives à *Candida* spp. représentent la 3^{ème} cause la plus fréquente d'infections sanguines nosocomiales (Whibley *et al.* 2015) (**Figure 12**). L'incidence annuelle de ces candidoses invasives rapportée à la population internationale a

été évaluée entre 1,5 et 8 pour 100000 personnes (Yapar 2014; Arendrup 2010). Elles peuvent avoir différentes origines :

- Une origine endogène à partir d'un foyer préexistant, la plupart du temps digestif (Nucci et Anaissie 2001) ;
- Une origine exogène, notamment par la mise en place de cathéters ou prothèses contaminées (Alp *et al.* 2015; Talpaert *et al.* 2015; Douglas 2003).

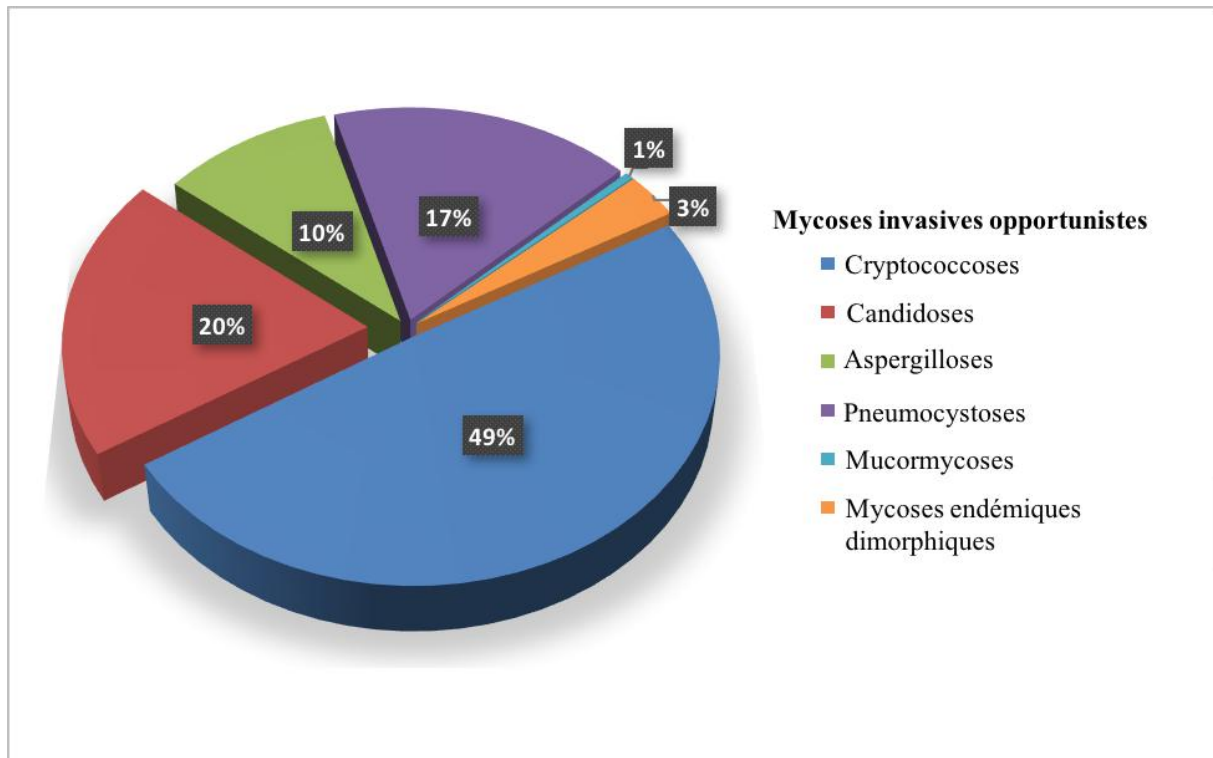


Figure 12 : Fréquences des principales infections fongiques invasives à travers le monde.

Mycozes endémiques invasives : blastomycoses, coccidioïdomycoses, histoplasmoses, paracoccidioïdomycoses et penicillioses (Brown *et al.* 2012).

2.1. Les septicémies à *Candida*

La candidémie, ou septicémie à *Candida*, est définie comme telle lors de la présence d'au moins une hémoculture positive à *Candida* spp. L'incidence des candidémies est estimée entre 2 et 25 cas pour 100 000 par an, avec des variations géographiques (Yapar 2014; Arendrup 2010) et elle a été estimée à 2,5 cas pour 100 000 par an en France au cours d'une étude du PMSI (Programme de Médicalisation des Systèmes d'Information) entre 2001 et 2010 (Bitar *et al.* 2013). Celle-ci est également plus élevée dans les services de soins intensifs où elle représente la 3^{ème} cause d'infection nosocomiale (Vincent *et al.* 2009) et le taux de

mortalité est d'environ 50% (Arendrup 2010; Perlroth *et al.* 2007). En ce qui concerne les espèces mises en cause, l'incidence de *C. albicans* a diminuée (environ 50% des cas) au profit des espèces non-*albicans* (Yapar 2014).

2.2. Les candidoses disséminées

La candidose oculaire peut survenir dans 10 à 40% des candidémies. Ces endophtalmies endogènes se retrouvent principalement chez des patients non-neutropéniques et des toxicomanes (toxicomanie intraveineuse). La candidose oculaire a une symptomatologie peu spécifique (diminution de l'acuité visuelle, douleurs oculaires, photophobie...). Les espèces les plus souvent isolées sont *C. albicans* et *C. tropicalis* (Oude Lashof *et al.* 2011).

L'endocardite à *Candida* est une grave complication de la candidémie. Bien qu'elle représente seulement 1 à 2% des endocardites chez l'adulte, son taux de mortalité reste élevé (30-45%). On la retrouve le plus souvent chez des patients après chirurgie cardiaque avec des lésions préexistantes sur une valve native ou prothétique ainsi que les porteurs d'un cathéter veineux central et ce plusieurs semaines, voire plusieurs mois après leur séjour en unité de soins intensifs. Il est également à noter que les hémocultures ne sont pas toujours positives. Les espèces les plus souvent retrouvées dans les cas d'endocardites sont *C. albicans* et *C. parapsilosis* (Kauffman 2015).

La péritonite à *Candida* est définie comme une infection abdominale suite à une perforation du tube digestif ou à sa nécrose. Parmi les différents organismes isolés dans le liquide péritonéal des péritonites, les levures de *Candida* sont le plus souvent isolées, et notamment *C. albicans* et *C. glabrata*. Celles-ci sont favorisées par la nutrition parentérale et sont des complications de chirurgie abdominale et représentent entre 2 à 41 % des péritonites selon les études (Hasibeder et Halabi 2014; Plantefève *et al.* 2004).

La méningite à *Candida* est une infection du système nerveux central. L'apparition d'abcès cranio encéphalique peut être un phénomène isolé ou être associé à une méningite. La localisation neuroméningée de *Candida* peut survenir comme une manifestation d'une candidose disséminée que l'on retrouve le plus fréquemment chez les enfants prématurés atteints ou non de maladies hématologiques (Pahud *et al.* 2009; Cohen-Wolkowicz *et al.* 2007; Fernandez *et al.* 2000). Les infections de système nerveux central à *Candida* sont le plus souvent causées par l'espèce *C. albicans*.

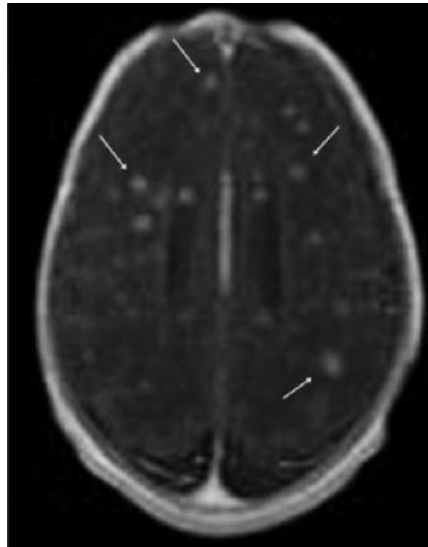


Figure 13 : Image par résonance magnétique (IRM) du cerveau d'un nouveau-né prématuré atteint d'une candidose neuroméningée.

Les flèches montrent de nombreux microabcès à *Candida* (Pahud *et al.* 2009).

La candidose disséminée chronique (CDC), aussi appelée candidose hépato-splénique, est retrouvée presque exclusivement chez des patients atteints d'hémopathies malignes comme les leucémies lymphoïdes chroniques aiguës mais aussi notamment lorsqu'il y a neutropénie et suite à la restitution immunitaire (Rammaert *et al.* 2012; Masood et Sallah 2005). La fréquence des CDC rapportée chez les patients atteints de leucémie aiguë ou suite à une transplantation de moelle osseuse est comprise entre 3 et 29% suivant les études (Masood et Sallah 2005). Bien que la première description clinique de la candidose hépatosplénique ait été faite dans les années 1960, sa physiopathologie complexe reste encore mal comprise et commence à être décrite grâce aux avancées techniques en immunologie. Toutefois, il semble y avoir un rôle d'une réaction post-inflammatoire exacerbée dans l'apparition des manifestations cliniques (Kontoyiannis *et al.* 2000). Le diagnostic d'une CDC se fait par imagerie médicale (IRM, tomodensitométrie) de la présence de multiples lésions hypodenses, le plus souvent au niveau du foie et/ou de la rate, aussi appelées micro-abcès et peut être confirmée par l'anatomopathologie (**Figure 14**).

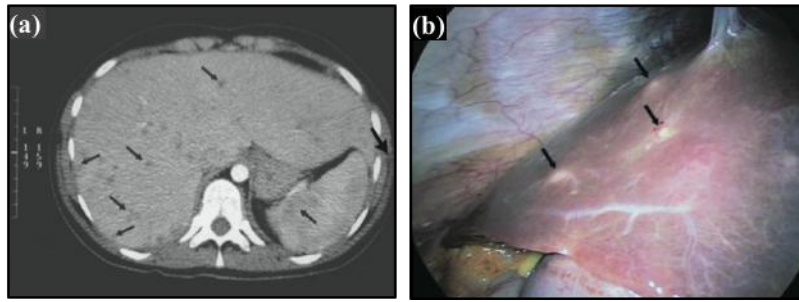


Figure 14 : Diagnostic et histologie de candidose disséminée chronique (CDC).

(a) Tomodensitométrie abdominale montrant de multiples lésions denses dans le foie et la rate (flèches noires), (b) photographie de laparoscopie, *C. albicans* a été identifié dans les lésions (flèches noires) (Halkic et Ksontini 2007).

3. Facteurs de risques des candidoses

Du fait de leur caractère opportuniste, les levures du genre *Candida* peuvent engendrer la pathologie à partir du moment où il y a altération des barrières anatomiques, mais aussi en présence de toute maladie sous-jacente affaiblissant l'immunité de l'hôte ou lors d'un déséquilibre de la flore endogène normale. On peut distinguer différents types de facteurs favorisants : ceux liés à l'hôte (ou intrinsèques) ou locaux et ceux extrinsèques.

3.1. Facteurs de risque liés à l'hôte (intrinsèques)

3.1.1. Facteurs physiologiques

Il est à noter que les âges extrêmes de la vie sont des facteurs favorisant pour le développement des candidoses buccales. En effet, les nouveau-nés sont plus sensibles du fait de l'immaturation de leur système immunitaire mais aussi de leur flore microbienne encore incomplète. Le plus souvent la contamination est d'origine maternelle, lors de l'accouchement. Chez les personnes âgées, le port de prothèses bucco-dentaires, mais aussi l'affaiblissement des fonctions immunitaires seraient en cause des infections à *Candida*.

La grossesse, de part une modification de pH vaginal, rend les femmes enceintes particulièrement sensibles au développement des levures notamment au 3^{ème} trimestre, où la fréquence des candidoses vaginales est 3 à 4 fois plus élevée.

La macération, la transpiration, la chaleur et l'humidité mais aussi un défaut de trophicité des muqueuses sont autant de facteurs qui peuvent favoriser l'installation et le développement des candidoses cutanées et des muqueuses.

3.1.2. Maladies sous-jacentes

Toute maladie provoquant une baisse des défenses immunitaires est susceptible d'induire le déclenchement d'une candidose (Yapar 2014; Rammaert *et al.* 2012; Masood et Sallah 2005). Un certain nombre de facteurs peuvent favoriser l'apparition d'infections opportunistes au cours d'un cancer. Le cancer lui-même peut entraîner des ouvertures (ulcérations, plaies ...) qui constituent de véritables portes d'entrée à *Candida* dans les muqueuses ou à travers les épithélia. Une leucémie entraîne une diminution de l'immunité innée et/ou humorale qui favorise l'apparition de maladies opportunistes. Les traitements contre le cancer (radiothérapie, chimiothérapie, greffes) de par leur toxicité peuvent causer une insuffisance immunitaire (immunomodulateurs : IFN- α , IL-2 ; inhibiteurs de tyrosine-kinase). Parmi les patients immunodéprimés, le risque de candidose est plus élevé pour les patients présentant une neutropénie, souvent profonde (Horn *et al.* 2009).

Avant la mise en place des multi thérapies antirétrovirales (HAART), l'incidence des candidoses buccales était très élevée et en constante augmentation chez les patients immunodéprimés atteints du VIH au cours du SIDA (Tumbarello *et al.* 1999). Aujourd'hui, même si l'incidence des candidoses oropharyngées a significativement diminuée (Patuwo *et al.* 2015), ces infections restent courantes chez les patients VIH.

Le diabète sucré est associé à une hyperglycémie mais aussi à une diminution des fonctions immunitaires des neutrophiles et lymphocytes T et des troubles de l'immunité humorale. De ce fait, les patients diabétiques sont fréquemment atteints de candidoses urinaires et oropharyngées (Casqueiro *et al.* 2012). D'autres maladies endocriniennes comme le syndrome de Cushing et l'hypothyroïdie sont fréquemment impliquées dans le développement de candidoses.

3.2. Facteurs de risque extrinsèques

3.2.1. Facteurs alimentaires

Il semble que certaines carences nutritionnelles (déficits en fer) ou une trop grande consommation de glucides soient propices au développement de candidoses chroniques et augmente le saprophytisme intestinal de *Candida*. La nutrition parentérale est également un facteur de risque souvent rapporté. En fonction des études il serait présent jusque chez 37% des patients (Yapar 2014; Horn *et al.* 2009).

3.2.2. Antibiothérapie à large spectre

Cette dernière favorise la colonisation intestinale de *Candida* en altérant la flore bactérienne et en déstabilisant l'équilibre commensal. L'antibiothérapie à large spectre dans les jours précédant une candidémie est un facteur de risque très fréquemment rencontré (Tadec *et al.* 2016; Yapar 2014).

3.2.3. Traitements immunosuppresseurs et anti-cancéreux

Le plus souvent cytotoxiques, ils sont utilisés en traitement de certains cancers et entraînent des diminutions des défenses immunitaires de l'hôte, le prédisposant ainsi au développement de pathologies opportunistes telles que les candidoses. Ainsi, la corticothérapie est un facteur de risque majeur pour les patients leucémiques comme pour les patients transplantés. Ce traitement entraîne une diminution du nombre des cellules mononuclées, une altération des capacités chimiotactiques et cytotoxiques de ces cellules, une réduction de leur migration vers les sites d'infections, et donc une diminution de la phagocytose et de la toxicité vis-à-vis de *Candida*.

3.2.4. Cathéters et autres dispositifs intraveineux

La présence d'un cathéter veineux central est un facteur de risque retrouvé chez un grand nombre de patients atteints de candidémie (Yapar 2014). La présence d'un cathéter central est retrouvée pour 64% des épisodes de candidémie dans une étude monocentrique espagnole (Ortega *et al.* 2011) et dans 75,9% des épisodes lors d'une étude française (Tadec *et al.* 2016).

3.2.5. Transplantation d'organes solides

Lors d'une greffe d'organes solides, la principale complication reste l'infection, et notamment les infections fongiques invasives. Le réseau américain TRANSNET (Transplant-Associated Infection Surveillance Network) a permis de mettre en évidence l'importance des candidoses chez les patients greffés d'organe solide. Sur 1208 infections fongiques invasives durant une période de 2001 à 2006, 52,9% soit 639 étaient des candidoses invasives (Pappas *et al.* 2010) (**Figure 15**).

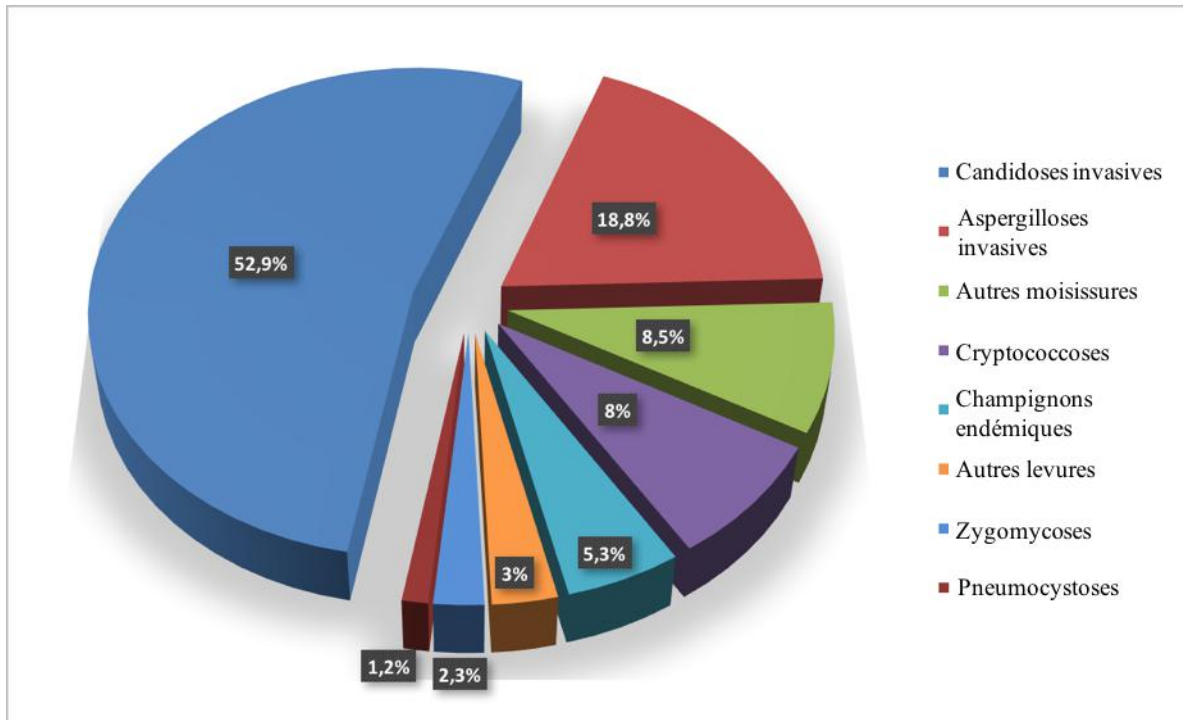


Figure 15 : Infections fongiques invasives chez 1063 receveurs d'organes solides
(Pappas *et al.* 2010)

Dans ces 639 cas de candidose, les espèces les plus fréquemment isolées sont *C. albicans* (46,3%) suivi de *C. glabrata* (24,4%) et *C. parapsilosis* (8,1%) et en ce qui concerne le site de l'infection, 44% des cas étaient des candidémies et 14% des cas correspondaient à une localisation intra-abdominale (Andes *et al.* 2016). Celles-ci surviennent généralement dans les premiers temps après la greffe, les patients cumulant plusieurs facteurs de risque (chirurgie lourde, séjour en unité de soins intensifs, traitement immunosuppresseur, cathéter veineux central).

3.2.6. Soins intensifs et chirurgie

Les différentes études menées sur les candidoses invasives montrent que les patients hospitalisés dans les services de soins intensifs et de chirurgie sont les plus susceptibles de développer cette infection (Yapar 2014). Les données du programme SENTRY, qui est un programme de surveillance international incluant plusieurs pays Européens, Nord-Américains et Sud-Américains, montre que 44,5% des candidémies sont acquises dans les services de soins intensifs pour la période 2008-2009 (Pfaller *et al.* 2011). En Europe, dans l'étude de l'ECMM (European Confederation of Medical Mycology) menée entre 2006 et 2008 sur 779 patients hospitalisés en unités soins intensifs après une chirurgie, 80,5% des candidoses

invasives ont été considérées comme acquises dans le service de soins intensifs (Klingspor *et al.* 2015). De la même manière, en France, dans une étude monocentrique, 27,7% des candidémies étaient retrouvées chez des patients provenant de services de soins intensifs et la chirurgie est en facteur de risque dans 25,7 % des cas (Tadec *et al.* 2016).

4. Diagnostic des candidoses

Lors d'une candidose, l'identification précise de l'espèce en cause à son importance notamment afin d'adapter le traitement du patient. Le diagnostic mycologique d'une candidose s'inscrit dans le cadre de la démarche habituelle du diagnostic en microbiologie et comporte trois étapes clés.

Tout d'abord l'examen direct et/ou anatomo-pathologique du produit biologique ou de la pièce d'exérèse, qui est la première étape du diagnostic au laboratoire. Il permet de constater ou non la présence à l'état parasitaire de la levure au niveau du site prélevé, éventuellement d'orienter le diagnostic et de débiter une thérapeutique adaptée. L'étape suivante est la culture. Les levures du genre *Candida* peuvent pousser sur les milieux utilisés en bactériologie, toutefois le milieu Sabouraud est plus adapté.

Pour l'identification de l'espèce en cause, il existe différentes méthodes. La première est l'identification phénotypique qui se fait *via* des milieux de culture fluorogéniques ou chromogéniques. Afin d'identifier précisément l'espèce des souches isolées, il est nécessaire d'effectuer des tests complémentaires d'identification (et de ne pas se fier uniquement çà la couleur des colonies). Le test de blastèse ou de filamentation sur sérum exploite la capacité que possède *C. albicans* à produire des tubes germinatifs. Toutefois, ce test ne permet pas de distinguer les espèces du complexe *C. albicans* / *C. dubliniensis*. Le test de chlamydosporulation, met en évidence la présence ou non de chlamydospores qui sont des formes d'adaptation et de résistance sur milieux pauvres (PCB : pomme de terre, carotte, bile ou RAT : riz, agar, tween) et qui permet de distinguer *C. albicans* et *C. dubliniensis*. Des tests rapides existent également pour identifier certaines espèces (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* et *C. glabrata*). Il s'agit de tests immunologiques reposant sur une réaction d'agglutination antigène/anticorps où des particules de latex sont sensibilisées avec un anticorps monoclonal dirigé contre un antigène spécifique de la paroi de l'espèce à identifier et pour *C. glabrata*, la détection rapide de l'enzyme tréhalase.

Il existe également des galeries d'indentification biochimiques, utilisant les sucres ou les carbohydrates. Elles reposent notamment sur le principe du zymogramme avec la fermentation des sucres. La galerie API ID 32C (BioMérieux), très utilisée en routine, est capable de distinguer 63 espèces différentes. On trouve aussi des systèmes d'identification automatisés avec des temps d'incubation courts, tel que l'automate Vitek2 (BioMérieux).

La technique d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption-Ionisation Time Of Flight) est maintenant celle utilisée en routine et remplace maintenant l'identification phénotypique. En effet, cette approche protéomique permet une identification rapide et ce directement à partir des cultures. Une fois le spectre de masse de la levure à identifier obtenu, celui est comparé à une base de données de spectres de références établis pour chaque espèce (Bougnoux *et al.* 2013).

Quand les techniques classiques de routine sont mises en défaut, il est possible d'avoir recours à des techniques de biologie moléculaire plus performantes telle que l'identification par PCR (Polymerase Chain Reaction) panfongique suivie d'un séquençage des produits d'amplification. C'est la méthode la plus utilisée et elle est relativement précise (Lau *et al.* 2008). On utilise les gènes de l'ADN ribosomique car ils sont présents chez tous les micro-organismes et accumulent les mutations à un taux constant. Cette famille de gènes est répétée en tandem et chaque unité comprend les régions codantes pour l'ARN 18S, 5,8S et 28S ainsi que deux ITS (espaceurs internes transcrits) qui diffèrent selon l'espèce. C'est le polymorphisme des régions variables ITS qui est utilisé comme support de l'identification moléculaire des espèces fongiques (Bougnoux et Espinasse 2003).

5. Prise en charge thérapeutique des candidoses

Les premiers antifongiques systémiques ont été disponibles dans les années 1950 mais l'arsenal antifongique a longtemps été restreint à l'amphotéricine B et à la nystatine ayant pour cible l'ergostérol de la membrane plasmique. Actuellement, il n'existe encore que 6 classes de molécules antifongiques donc seulement 4 à usage systémique et n'agissant que sur 3 cibles fongiques différentes (Maubon *et al.* 2014). De plus, pour chaque classe d'antifongique, l'acquisition de mécanismes de résistance a été mise en évidence.

Les polyènes

Les molécules de la famille des polyènes sont produites par des actinomycètes du genre *Streptomyces*. Ce sont des macrolides, c'est à dire des molécules organiques cycliques amphotères présentant une grande affinité pour l'ergostérol (Chapman *et al.* 2011). Actuellement, seulement deux composés sont disponibles au sein de cette famille : la nystatine et l'amphotéricine B. L'amphotéricine B est disponible sous forme conventionnelle déoxycholate ou sous formes de dérivés lipidiques (liposomes, dispersion colloïdale, complexes lipidiques). Toutefois, en raison de sa formulation intraveineuse, l'amphotéricine B est utilisée pour traiter les infections fongiques invasives. Les polyènes ont un mode d'action qui repose sur leur fixation au niveau de l'ergostérol membranaire et la formation de pores qui augmentent la perméabilité et induisent un relargage d'ions incontrôlé conduisant à terme à la mort cellulaire (Chapman *et al.* 2011) (**Figure 16**). L'effet antifongique qui en résulte est de type fongicide sur les levures. L'amphotéricine B a une forte activité sur les levures du genre *Candida*. On peut toutefois remarquer le cas particulier de *C. lusitaniae* comme espèce naturellement moins sensible à l'amphotéricine B et comme étant susceptible de développer une résistance acquise (Pfaller *et al.* 2012; Sanglard et Odds 2002). Pour les autres espèces de *Candida*, la résistance acquise à cet antifongique reste exceptionnelle (Pfaller *et al.* 2012).

La 5-fluorocytosine

La flucytosine ou 5-fluorocytosine (5-FC) est une pyrimidine fluorée de synthèse qui est l'unique représentante de cette classe d'antifongique et qui inhibe sur la synthèse d'ADN et d'ARN (**Figure 16**). La flucytosine a un effet fongistatique *in vitro* et est active contre les levures du genre *Candida* et *Cryptococcus* (Larsen 2011; Vermes *et al.* 2000). La résistance à la 5-FC est assez fréquente et son usage en monothérapie est donc limité. Son action antifongique s'exerce d'une part *via* l'inhibition de la synthèse protéique suite à la conversion en 5-FU triphosphate et incorporation à l'ARN et, d'autre part, *via* l'inhibition de la thymidilate synthétase, enzyme essentielle à la biosynthèse de l'ADN après conversion en 5-FU monophosphate (Vermes *et al.* 2000).

Les azolés

Les molécules de la famille des azolés sont issues de la synthèse et représentent le plus grand nombre de molécules utilisées en clinique. Ces composés sont répartis en deux

groupes : les imidazolés et les triazolés. La plupart des composés imidazolés sont réservés à un usage topique en raison de leur toxicité et de leur biodisponibilité réduite qui limitent leur utilisation systémique. Les molécules autorisées pour la prise en charge des infections fongiques invasives sont toutes des triazolés : le fluconazole, l'itraconazole, le voriconazole et le posaconazole. Le mode d'action des azolés consiste en l'inhibition de la biosynthèse de l'ergostérol, principal composant de la membrane plasmique des champignons (Abe *et al.* 2009; Lupetti *et al.* 2002) (**Figure 16**) via l'inhibition spécifique de la stérol-14 α -déméthylase (aussi appelée Erg11p et Cyp51p) codée par le gène *ERG11* (Munayyer *et al.* 2004). Cette inhibition a trois effets majeurs : tout d'abord une déplétion en ergostérol et une modification de la perméabilité membranaire, une modification des protéines associées à la membrane (certaines impliquées dans la synthèse de la paroi cellulaire) et une synthèse de stérols toxiques et une accumulation de stérols 14 α -méthylés (Odds *et al.* 2003). Au final, il en résulte une altération de la membrane cytoplasmique fongique.

In vitro, la famille des azolés présente un spectre d'activité large et est active sur la plupart des levures du genre *Candida* (Pappas *et al.* 2009; Johnson *et al.* 2008; Sabatelli *et al.* 2006; Pfaller *et al.* 2004).

Une résistance ou une diminution de la sensibilité aux azolés chez *Candida* sp. peut-être observée par l'efflux actif de l'antifongique (Sanglard *et al.* 2009; Coste *et al.* 2006), la surproduction de l'enzyme cible (Erg11p) des azolés (Sanglard *et al.* 2009) ou la substitution d'acides aminés dans l'enzyme cible (Morio *et al.* 2010). De plus, des mutations de *ERG3* sont aussi associées à une résistance croisée aux azolés par remplacement de l'ergostérol par le fécostérol (Morio *et al.* 2012).

Les échinocandines

Les échinocandines sont des lipopeptides semi-synthétiques d'origine fongique altérant la paroi fongique. Actuellement, il existe 3 échinocandines disponibles : la caspofungine, la micafungine et l'anidulafungine. Leurs activités antifongiques reposent sur l'inhibition non compétitive de la glucane synthase, enzyme responsable de la synthèse du β 1,3-glucane, polymère du glucose indispensable à la structure et à l'intégrité de la paroi fongique (**Figure 16**). Les échinocandines entraînent un déséquilibre osmotique puis la lyse de la cellule fongique en brisant son intégrité structurale (Denning 2003). Cette classe d'agent antifongique administrée par voie parentérale constitue souvent la première ligne de traitement lors de la prise en charge des candidoses invasives (Pappas *et al.* 2009) et présente un spectre d'activité superposable. En effet, ces 3 molécules sont actives *in vitro* sur la très

grande majorité des levures du genre *Candida* (Chen *et al.* 2011a; Datry et Bart-Delabesse 2006).

La résistance aux échinocandines a été décrite chez *C. albicans* mais aussi pour plusieurs autres espèces : *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* et *C. krusei*. Des mutations confèrent une résistance croisée aux trois échinocandines par modification des propriétés catalytiques et cinétiques de l'enzyme cible (Maubon *et al.* 2014; Arendrup *et al.* 2013).

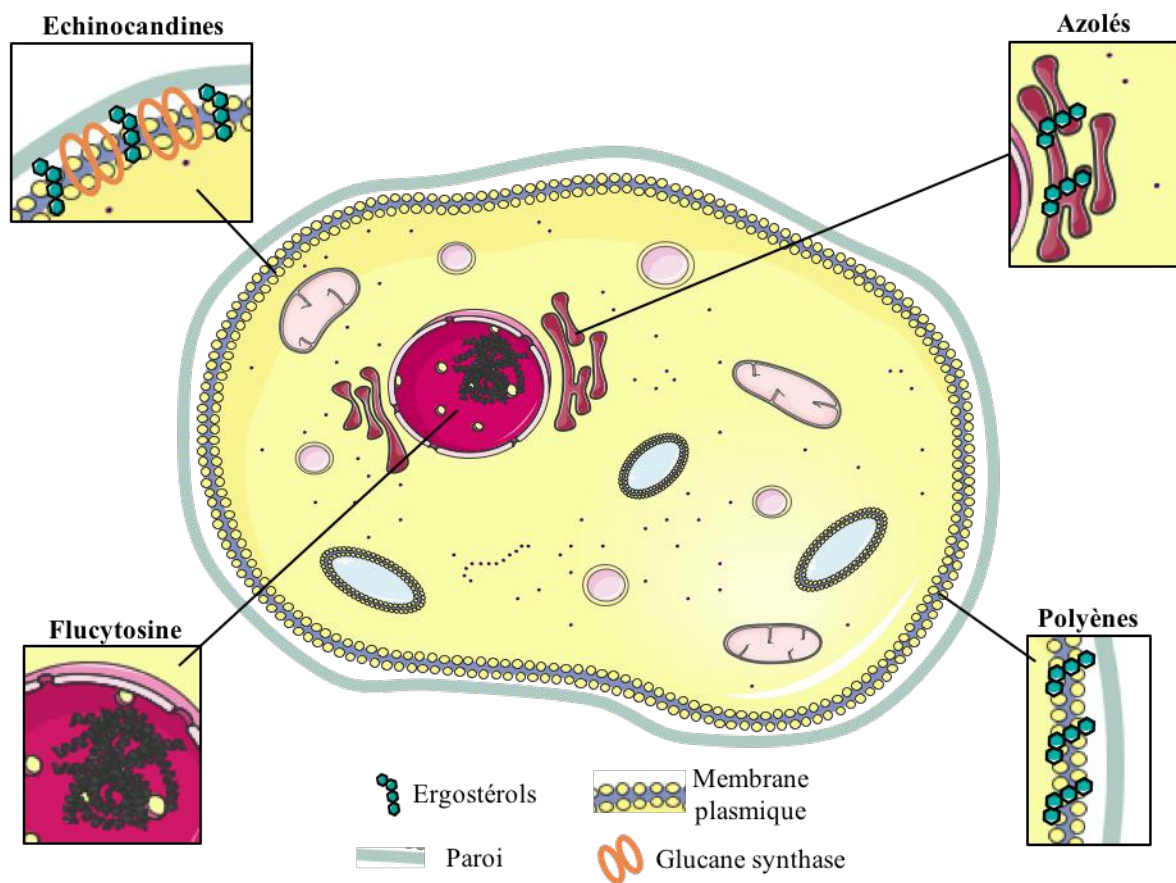


Figure 16 : Cibles des différentes classes d'antifongiques systémiques
(Maubon *et al.* 2014).

Chapitre III : L'interaction hôte-*Candida*

1. Notions générales

Un grand nombre d'organismes vivants sont exposés aux pathogènes. Dans de nombreux systèmes biologiques, un organisme dit pathogène (bactérie, virus, eucaryote unicellulaire ou pluricellulaire) peut envahir un autre, appelé hôte. Cet hôte offre un habitat, une source de nutriments et éventuellement un moyen de dispersion au pathogène. Lorsqu'un hôte rencontre un pathogène, une « guerre moléculaire » se met en place entre les deux protagonistes. Dans la plupart des associations hôte-pathogène, cette guerre a débuté il y a très longtemps (peut-être des millions d'années), ce qui a permis sous la pression de sélection, une coévolution ou course aux armements, appelée théorie de la Reine Rouge, entre les deux protagonistes (Combes 2010). Pour le pathogène, il y a une adaptation à son hôte grâce à la mise en place de mécanismes de résistance, d'adaptations métaboliques (comme par exemple l'augmentation de la capture des nutriments) et de stratégies d'échappement au système immunitaire dans le but de survivre au sein de l'hôte et de s'y multiplier. Il va ainsi manipuler son environnement-hôte et détourner la machinerie cellulaire de celui-ci afin de créer un habitat « métaboliquement modifié » qui lui sera favorable. L'hôte, quant à lui, répond à ces changements par une adaptation permanente afin d'améliorer ses systèmes de défense en mettant en place, par exemple, des changements de comportement ou encore une modulation de son système immunitaire (**Figure 17**).

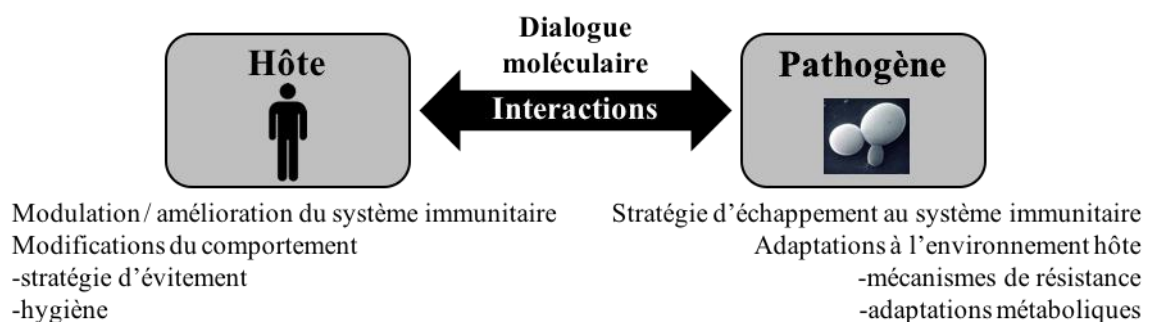


Figure 17 : Les interactions hôte-pathogènes.

Lorsqu'un pathogène prélève une partie des ressources de l'hôte, cela entraîne un effet pathogène qui peut être défini comme l'ensemble des conséquences de la présence du pathogène dans l'organisme hôte (par exemple au niveau de sa morphologie, son anatomie, son métabolisme, son comportement ou encore son activité de reproduction). Cet effet

pathogène ou virulence peut entraîner une diminution du succès reproductif ou fitness de l'hôte, ce qui favorise les mécanismes de défense chez l'hôte. La mise en place de ces stratégies de défense à un coût pour l'hôte, et va entraîner une redistribution des ressources énergétiques vers ses stratégies. Un compromis (ou trade-off) doit alors être arbitré entre la qualité des défenses mises en place et les traits de vie de l'hôte (Combes 2010).

Les interactions hôte-agent fongique ont été décrites comme commensales, symbiotiques et/ou pathogéniques. De façon intéressante, les mécanismes de symbiose et de pathogénicité montrent des points communs et mettent en évidence des tendances parallèles dans l'évolution entre hôte et champignon (Ochman et Moran 2001). La transition de commensal à pathogène dépend de petites différences (Martin et Nehls 2009) et les relations hôte-agent fongique peuvent changer en fonction des conditions environnementales (Hube 2004).

Une forte adhérence des agents fongiques aux surfaces par formation de biofilms protecteurs est importante pour la mise en place d'une croissance invasive (de Groot *et al.* 2013). Dans ce sens, les interactions hôte-pathogènes peuvent être caractérisées par la formation d'interfaces symbiotiques ou pathogéniques (Bonfante et Genre 2010). Ceci se rapporte en particulier aux interactions dans lesquelles les agents fongiques sont capables de franchir les barrières épithéliales et d'échapper au système immunitaire inné, capacités qui contribuent à l'agressivité des pathogènes (Horn *et al.* 2012).

Historiquement, la nature des dégâts causés à l'hôte par un microorganisme pathogène a longtemps été considéré comme étant dépendante des caractéristiques propres de virulence du microorganisme. Toutefois, il est maintenant admis que ces dégâts causés à l'hôte au cours d'une infection sont également le reflet du statut immunitaire de ce dernier et sont souvent dûs à la réponse de l'hôte face au pathogène. Par conséquent, l'infection qui résulte de l'interaction entre un microorganisme et un hôte est complexe et peut résulter aussi bien des dégâts causés par le microorganisme que par ceux causés par l'hôte en réponse à la présence de ce microorganisme ou bien des deux à la fois. Ce concept initialement introduit en 1999 par Casadevall et Pirofski appelé Damage Response Framework (DRF), explique la pathogénèse microbienne comme le résultat d'une interaction entre un hôte et un microorganisme et dont le devenir de l'hôte dépend des dégâts causés par celui-ci et / ou par le microorganisme, ce qui fournit une base pour une nouvelle classification des pathogènes basée sur la quantité de dégâts comme une fonction de la réponse de l'hôte (Casadevall et Pirofski 1999). Récemment, Jabra-Rizk et ses collaborateurs (2016) ont utilisé le concept de

DRF pour expliquer et définir la pathogénèse de *C. albicans*, qui est un microorganisme exceptionnellement bien adapté à son hôte humain comme commensal mais qui, comme pathogène, est responsable de divers types d'infections (aussi bien muqueuses que systémiques) et cela chez des individus immunocompétents ainsi qu'immunodéprimés (Jabra-Rizk *et al.* 2016). Dans ce cas, le concept de DRF offre un moyen de comprendre et d'illustrer les différentes formes de candidoses et ce, dans le contexte de la réponse de l'hôte et des dommages subis.

Les candidoses peuvent donc être le résultat soit de l'expression de facteurs de pathogénicité spécifiques au champignon, soit de facteurs liés à l'hôte ou enfin soit des deux à même temps.

2. Facteurs spécifiques à *Candida* :

Dans le cadre de l'interaction entre *Candida* et son hôte humain, l'extrême plasticité de ce microorganisme lui permet d'évoluer dans différents microenvironnements en tant que commensal au sein du microbiote humain. Mais ce sont également ces mêmes caractéristiques cellulaires acquises par le champignon pour vivre dans des conditions difficiles en tant que commensal qui lui fournissent les armes nécessaires pour surmonter les défenses de l'hôte et qui peuvent devenir des facteurs de virulence et de pathogénicité lorsque l'équilibre est rompu, faisant de *Candida* un pathogène de l'Homme (Kong *et al.* 2015; Pierce *et al.* 2013). La pathogénicité du genre *Candida* dépend d'un certain nombre de facteurs de virulence, les plus importants étant (i) l'adhésion aux tissus de l'hôte mais aussi à la surface des dispositifs médicaux, (ii) la formation de biofilm, (iii) la sécrétion d'enzymes hydrolytiques, et chez certaines espèces (iv) la transition entre la forme levure et la forme filamenteuse (Polke *et al.* 2015) (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Principaux facteurs de virulence chez *Candida* spp.

Espèces	Facteurs de virulence	Références
<i>C. albicans</i>	Dimorphisme (hyphe-pseudohyphe-levure)	Polke <i>et al.</i> 2015 Mayer <i>et al.</i> 2013 Soll 2014 Morchhäuser 2010
	Formation de biofilm	
	Production d'adhésines	
	Tropisme des hyphes	
	Changement de phénotype des levures	
	Production enzymes hydrolytiques	
	Activité hémolytique	
<i>C. dubliniensis</i>	Dimorphisme (hyphe-pseudohyphe-levure)	Thompson <i>et al.</i> 2011 Paugam <i>et al.</i> 2008 Chen <i>et al.</i> 2011 Pujol <i>et al.</i> 2004 Rossoni <i>et al.</i> 2013 de Groot <i>et al.</i> 2013 Silva <i>et al.</i> 2014
	Formation de biofilm	
	Production d'adhésines	
	Thigmotropisme des hyphes	
	Changement de phénotype des levures	
	Production enzymes hydrolytiques	
	Activité hémolytique	
<i>C. tropicalis</i>	Dimorphisme (hyphe-pseudohyphe-levure)	Deorukhkar <i>et al.</i> 2014 Nikawa <i>et al.</i> 1999 Porman <i>et al.</i> 2013 de Groot <i>et al.</i> 2013 Rossoni <i>et al.</i> 2013
	Formation de biofilm	
	Production d'adhésines	
	Thigmotropisme des hyphes	
	Changement de phénotype des levures	
	Production enzymes hydrolytiques	
	Activité hémolytique	
<i>C. lusitaniae</i>	Formation de pseudohyphes	Thompson <i>et al.</i> 2011 Pannanusorn <i>et al.</i> 2013 de Groot <i>et al.</i> 2013 Silva <i>et al.</i> 2014 Rossoni <i>et al.</i> 2013
	Formation de biofilm	
	Production d'adhésines	
	Production enzymes hydrolytiques	
	Activité hémolytique	
<i>C. glabrata</i>	Formation de pseudohyphes	Thompson <i>et al.</i> 2011 Silva <i>et al.</i> 2011 de Groot <i>et al.</i> 2013 Kaur <i>et al.</i> 2007 Rossoni <i>et al.</i> 2013
	Formation de biofilm	
	Production d'adhésines	
	Production enzymes hydrolytiques	
	Activité hémolytique	
<i>C. parapsilosis</i>	Formation de pseudohyphes	Thompson <i>et al.</i> 2011 Silva <i>et al.</i> 2011 de Groot <i>et al.</i> 2013 Silva <i>et al.</i> 2014 Rossoni <i>et al.</i> 2013
	Formation de biofilm	
	Production d'adhésines	
	Production enzymes hydrolytiques	
	Activité hémolytique faible	
<i>C. kefyr</i>	Formation de pseudohyphes	Thompson <i>et al.</i> 2011 Muadcheingka <i>et al.</i> 2015 Kantarcioglu <i>et al.</i> 2002 Negri <i>et al.</i> 2012
	Formation de biofilm	
	Production d'adhésines	
	Production enzymes hydrolytiques	
	Activité hémolytique	
<i>C. krusei</i>	Formation de pseudohyphes	Garcia-Rodas <i>et al.</i> 2011 Pannanusorn <i>et al.</i> 2013 Negri <i>et al.</i> 2012 Kumar <i>et al.</i> 2009 Rossoni <i>et al.</i> 2013
	Formation de biofilm	
	Faible production d'adhésines	
	Production enzymes hydrolytiques	
	Activité hémolytique	

2.1. Production d'adhésines

La famille de protéines ALS

L'adhésion de *Candida* aux cellules de l'hôte permet d'initier la colonisation et l'infection. En effet, *Candida* spp. est capable d'adhérer à différents substrats et tissus *via* des molécules appelées adhésines. Ces adhésines sont codées par une famille de gènes appelée ALS (agglutinin-like sequence) qui compte au moins 9 membres chez *C. albicans* (Hoyer *et al.* 2008; Hoyer 2001). Les gènes ALS sont composés de trois domaines : un domaine 3' qui code pour une ancre GPI et pour une séquence peptidique riche en sérine et thréonine, un domaine central comportant une région répétée en tandem et un domaine N-terminal conservé responsable des propriétés adhésives (Liu et Filler 2011) (**Figure 18**). La protéine Als3 est codée par le gène *ALS3* et son expression est régulée au niveau transcriptionnel. Le gène *ALS3* est exprimé par *C. albicans* seulement sous forme d'hyphe ou de pseudohyphe. Als3 permet la fixation de ces formes aux cellules épithéliales et endothéliales mais aussi aux protéines des matrices extracellulaires (Liu et Filler 2011). La présence de gènes ALS-like a été confirmée chez d'autres espèces que *C. albicans* (de Groot *et al.* 2013).

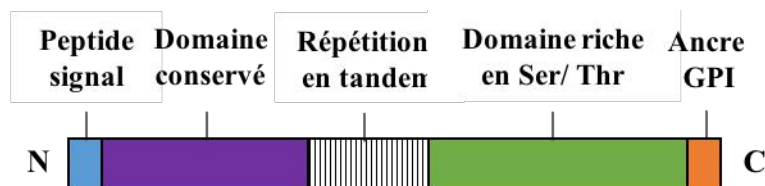


Figure 18 : Diagramme schématisique de la structure des gènes ALS

Les différentes espèces de *Candida* possèdent de multiples types d'adhésines différents qui peuvent varier quantitativement et qualitativement selon les espèces mais aussi selon le stade de développement chez l'hôte (commensal ou pathogène, forme levure ou filamenteuse) (**Tableau 4**). En effet l'adhésion aux cellules est requise aussi bien en croissance commensale que lors de l'invasion d'une nouvelle niche chez l'hôte.

Hwp1 (Hyphal Wall Protein 1)

La protéine pariétale Hwp1 (Hyphal Wall Protein 1) est une mannoprotéine liée de façon covalente aux β -1,6-glucanes de la paroi par sa partie C-terminale (Staab *et al.* 1999). Cette protéine spécifique du stade hyphe chez *C. albicans* joue un rôle important dans l'adhésion aux tissus (Sharkey *et al.* 1999). Comme pour les protéines Als, c'est la partie N-

terminale, riche en glutamine et proline, qui comporte les propriétés adhésives, car c'est un substrat pour les transglutaminases des cellules épithéliales, ce qui permet aux hyphes de *C. albicans* d'y adhérer de manière stable et covalente (de Groot *et al.* 2013). Hwp1 joue également un rôle crucial dans la formation de biofilm mais aussi lors de la reproduction sexuée de *C. albicans* (Ene et Bennett 2009; Nobile *et al.* 2006).

2.2. Production d'enzymes hydrolytiques

Les Secreted Aspartyl Proteases (Sap)

Cette famille d'enzymes protéolytiques, bien caractérisée chez *Candida* spp., comporte 10 membres chez *C. albicans* (Naglik *et al.* 2004; Naglik *et al.* 2003). Les Saps peuvent être considérées comme les plus importantes enzymes hydrolytiques parmi les facteurs de virulence chez *Candida* spp. En effet, elles ont une large spécificité de substrats et sont capables de dégrader une grande variété de protéines humaines comme l'albumine, l'hémoglobine, la kératine, le collagène, la fibronectine, les mucines et presque toutes les immunoglobulines (Silva *et al.* 2014). Le rôle et l'action des Saps dans les processus d'invasion et de dommage tissulaires ont été prouvés par le fait que l'invasion est clairement inhibée par la pepstatin A chez *C. albicans*, un inhibiteur des aspartyl protéases (Dalle *et al.* 2010). Des Saps associées à la formation d'hyphes (codées par *SAP4*, *SAP5* et *SAP6*) chez *C. albicans*, favorise la pénétration et la destruction des tissus environnants et permet ainsi la libération de nutriments des cellules hôtes (Kumamoto et Vincens 2005) (**Figure 19**).

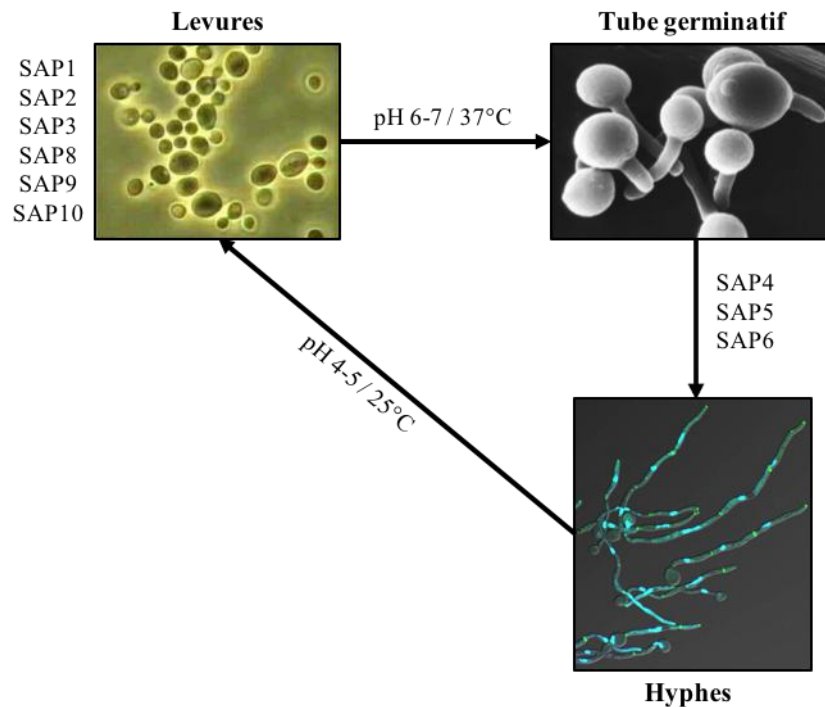


Figure 19 : Expression différentielle des gènes SAP en fonction du stade morphologique de *C. albicans*.

(Dos Santos 2010).

De plus, l'expression des gènes *SAP* est régulée par la disponibilité des sources de carbone et d'azote (Hube *et al.* 1994). Les gènes de la famille des *SAP* codent pour des préproenzymes qui seront transformées au cours de la sécrétion. Toutes les protéines de la famille des Saps possèdent 2 résidus aspartate et 4 résidus cystéine conservés. Toutefois, Sap9 et Sap10 diffèrent des autres isoenzymes par la présence d'une ancre GPI au niveau de l'extrémité C-terminale (Naglik *et al.* 2004).

En plus des Saps, des enzymes classées comme lipases et phospholipases (PLs) sont aussi considérées comme des facteurs associés à la pathogénicité de *Candida*.

Les phospholipases (PLs)

Les PLs sont des enzymes qui hydrolysent les phospholipides communs à toutes les membranes cellulaires en acides gras. En fonction des différents ponts ester clivés, ces enzymes ont été classées en quatre groupes : A, B, C et D. La production de toutes les classes de PLs a été décrite pour *Candida* et leur présence contribue aux dommages causés aux membranes cellulaires de l'hôte (Silva *et al.* 2011). Cela peut également permettre d'exposer des récepteurs facilitant l'adhésion de *Candida* aux cellules de l'hôte (Ghannoum 2000).

Les lipases

Les lipases permettent aux cellules fongiques d'assurer leur croissance dans des environnements où les lipides représentent l'unique source de carbone (Stehr *et al.* 2003). Les lipases sont impliquées aussi bien dans l'hydrolyse que la synthèse des triacylglycérols. Chez *C. albicans*, 10 gènes lipase (*LIP*) ont été identifiés. Leur rôle dans la pathogénicité a été montré avec des mutants *C. albicans* déficients en *LIP8* et montrant une virulence moindre (Gacser *et al.* 2007). Les autres espèces de *Candida* sont aussi capables de sécréter des enzymes hydrolytiques (**Tableau 4**). *C. glabrata*, elle, ne possède pas de gènes *SAPs* mais on retrouve chez cette espèce des protéines Sap-like (Kaur *et al.* 2007). Récemment, la sécrétion des lipases par *C. parapsilosis* a fait l'objet d'une étude révélant leur importance dans la virulence de cette espèce (Toth *et al.* 2015).

2.3. L'activité hémolytique

Les espèces de *Candida* produisent des hémolysines qui dégradent l'hémoglobine et permettent d'extraire le fer des cellules hôtes. L'hémolysine est donc un facteur de virulence clef qui permet la survie et la persistance du pathogène chez l'hôte. *C. albicans* a également la capacité d'utiliser le fer acquis pour produire un facteur hémolytique qui permet de libérer encore plus d'hémoglobine par lyse des globules rouges (Watanabe *et al.* 1999). L'expression génétique de l'activité hémolytique par *Candida* spp. est encore mal comprise mais il a été montré que l'expression du gène haemolysin-like protein (*HLP*) est associée avec l'activité hémolytique de *C. glabrata* (Luo *et al.* 2004). De plus, le fait qu'une activité hémolytique soit retrouvée chez de nombreuses espèces (**Tableau 4**) semble en faire un facteur de virulence important pour *Candida* (Rossoni *et al.* 2013).

2.4. Le dimorphisme

La morphogénèse, en particulier le « switch » morphologique, permet à la levure de passer d'une forme blastoconidie à une forme filamenteuse (hyphe ou pseudohyphe) et ce de manière réversible. Certaines espèces forment des filaments vrais (*C. albicans*, *C. dubliniensis* et *C. tropicalis*) et d'autres forment des pseudohyphes qui sont des cellules ellipsoïdes à septum resserré (**Figure 20**) (Thompson *et al.* 2011; Sudbery *et al.* 2004). Toutes ces transitions morphologiques sont mises en place dès lors que *Candida* se trouve face à des

changements environnementaux, et permettent ainsi au champignon de s'adapter à différents biotopes.

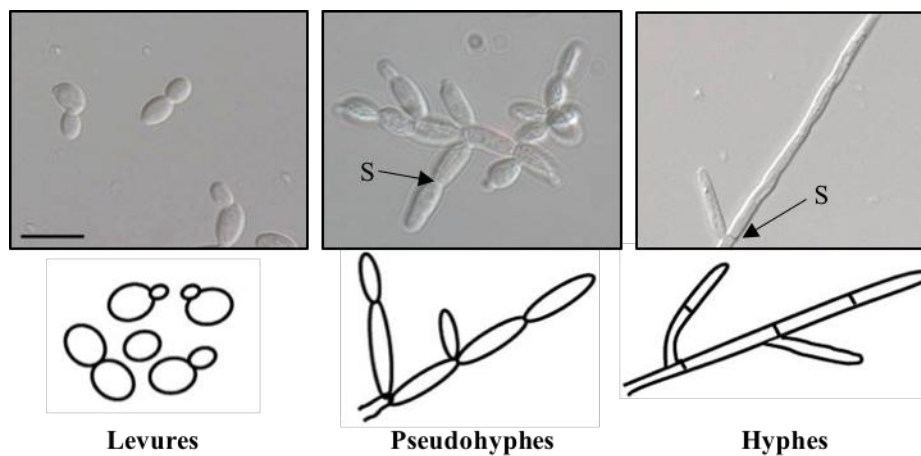


Figure 20 : Principales formes morphologiques de *Candida*.

Haut : Images de cellules de *C. albicans* obtenues par microscopie de contraste interférentiel (barre = 10 μm ; S = septum) ; **bas** : représentation schématique de chaque morphologie (Thompson *et al.* 2011).

Il a longtemps été pensé que le dimorphisme était essentiel pour la virulence de *C. albicans* car des souches mutantes incapables de morphogénèse montraient une virulence atténuée dans des modèles murins (Murad *et al.* 2001; Braun *et al.* 2000; Lo *et al.* 1997). Toutefois il semble que cette vision des choses est simplifiée car la formation des hyphes est co-régulée avec plusieurs autres facteurs associés à la virulence et il est donc difficile de savoir dans quelle mesure chacun contribue à cette virulence. Le modèle veut que les formes levure et filamenteuse soient toutes deux importantes au cours de l'infection mais avec des rôles distincts au cours des différentes étapes de l'infection (Kumamoto et Vines 2005). En effet, les deux formes peuvent être retrouvées au cours d'une infection systémique, les levures étant proposées comme importantes pour la dissémination *via* le système sanguin alors que les filaments sont plutôt associés à l'invasion des tissus (Jacobsen *et al.* 2012).

En effet, la formation d'hyphes est déclenchée par des signaux environnementaux qui ressemblent à des conditions de croissance défavorables ou à un possible environnement défavorable tels qu'une augmentation de température, un pH neutre, la présence de sérum et/ou de certains nutriments, un manque en nutriments, les niveaux d' O_2 et de CO_2 , le contact avec des surfaces physiques ou encore la densité cellulaire (Sudbery 2011).

Le dimorphisme requiert deux étapes : l'initiation de la filamentation et le maintien des hyphes (Sudbery 2011). L'initiation de la filamentation en réponse à une élévation de température requiert la suppression du répresseur de filamentation *NRG1* des régions promotrices des HAGs (hypha-associated genes) (Lu *et al.* 2011). Le maintien des hyphes, est garanti grâce à la liaison du facteur de transcription Brg1 sur les promoteurs des HAGs en absence de *NRG1* ce qui induit le recrutement l'histone déacétylase Hda1. Hda1 permet à son tour le remodelage de la chromatine qui met en place le maintien des hyphes et l'expression des HAGs (Su *et al.* 2013; Lu *et al.* 2012).

L'induction du passage levure à hyphe peut aussi être influencé par de nombreuses molécules comme par exemple des molécules du quorum sensing, des acides gras, des inhibiteurs du cycle cellulaire, des peptides et des protéines... (Shareck et Belhumeur 2011). Certaines de ces molécules sont produites par le champignon lui-même pour autoréguler la formation de filaments en présence d'un stimulus environnemental, d'autres peuvent être produites par l'hôte ou le microbiote de l'hôte pour manipuler la morphogénèse de *Candida*.

D'autres voies de signalisation, activées par divers signaux environnementaux, stimulent le dimorphisme et l'expression de HAGs. Ces voies incluent l'inhibition d'Hsp90 par des températures élevées et donc l'activation de Ras1, l'activation de Rim101 par un changement de pH, l'activation de Efg1/Efh1 induite par l'hypoxie, les ROS (reactive oxygen species) induites par un stress génotoxique, la voie de signalisation des MAPK *via* Ras1/Hst7 et Cek1... (Inglis et Sherlock 2013; Gow *et al.* 2011).

Finalement, les différentes voies de signalisation permettent l'activation ou l'inhibition de régulateurs de la transcription clefs (comme Efg1, Nrg1...) qui contrôlent l'expression des gènes nécessaires à la formation d'hyphes.

2.5. Le tropisme des hyphes

La formation et la croissance des hyphes peuvent être orientée en direction d'un signal : il s'agit du tropisme. Pour *C. albicans* cela inclus la capacité à réorienter la croissance des hyphes en réponse à un signal environnemental (Brand et Gow 2009). Le thigmotropisme, c'est à dire la réorientation de la croissance des hyphes en fonction de la configuration de la surface est le plus étudié chez *C. albicans*. Celui-ci est facilité par des mécano-récepteurs présents dans la membrane des hyphes, comme Fig1/Mid1, qui active l'influx d'ions Ca^{2+} extracellulaires (Yu *et al.* 2012; Yang *et al.* 2011). Les gradients d'ions Ca^{2+} permettent enfin de guider la réorientation de la croissance des hyphes (Brand et Gow 2009). Le fait que les

hyphes de *C. albicans* pénètrent les différents tissus et surfaces de l'hôte au niveau des jonctions cellulaires serrées (Gow *et al.* 2011; Jayatilake *et al.* 2005), montre que les hyphes peuvent utiliser le thigmotropisme *in vivo* afin de détecter et de répondre aux changements topographiques des surfaces cellulaires de l'hôte (Sherwood *et al.* 1992) (**Figure 21**)

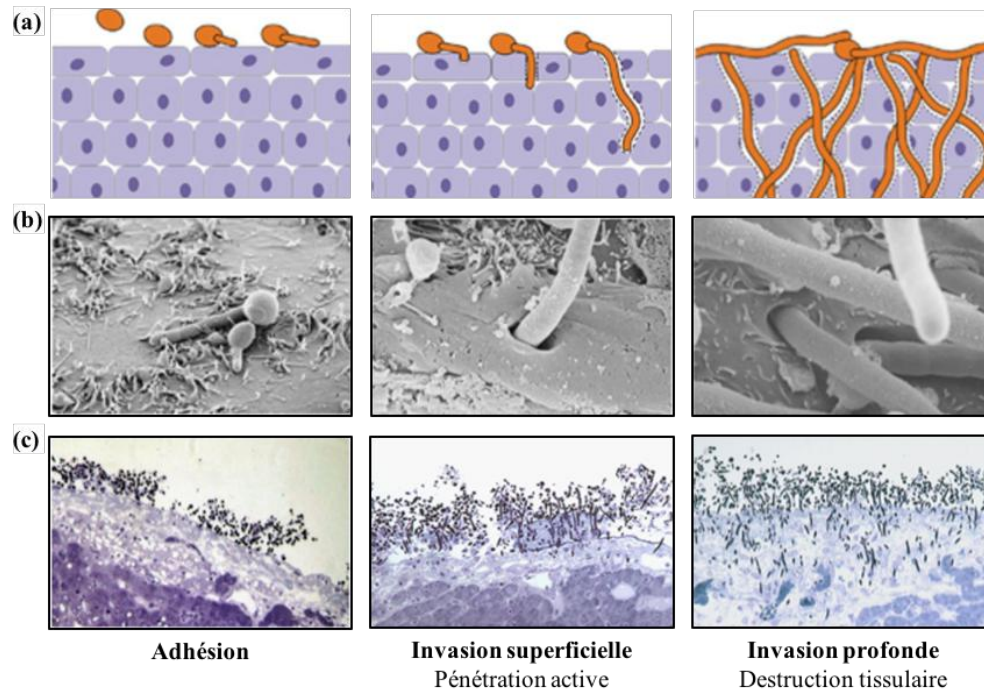


Figure 21 : Le thigmotropisme permet l'invasion de tissus par *C. albicans*.

(a) Schéma représentant l'infection tissulaire de *C. albicans* caractérisée par l'adhésion et la formation d'hyphes, puis par l'invasion superficielle des tissus suivie de l'invasion profonde par les hyphes entre les cellules au niveau des jonctions cellulaires serrées. (b) Photographies montrant les 3 stades de colonisation tissulaire (MEB). (c) Histologie montrant l'invasion progressive de tissu hépatique par *C. albicans* (figure adaptée de (Wilson *et al.* 2009).

Chez *C. albicans*, il a également été mis en évidence l'existence du chémotropisme (orientation *via* des produits chimiques), de l'aérotropisme (orientation en fonction des niveaux d'oxygène) et du galvanotropisme (orientation le long d'un courant électrique). Chez *C. dubliniensis* et *C. tropicalis* seul le thigmotropisme des hyphes a été démontré (Chen *et al.* 2011b; Nikawa *et al.* 1999). Le tropisme semble jouer un rôle important dans la pénétration et les dégâts causés aux tissus et épithélium.

2.6. Les changements phénotypiques

En plus du dimorphisme, *Candida* peut subir des changements phénotypiques (Soll 1992) dont le plus étudié est la transition de cellules blanches à opaques qui est nécessaire pour la reproduction sexuée (Soll 2014; Morschhauser 2010; Miller et Johnson 2002).

En 2002, Miller et Johnson mettent en évidence le fait que la transition phénotypique est essentielle à la reproduction sexuée chez *C. albicans* (Miller et Johnson 2002). Par défaut, chez cette espèce les cellules sont de forme ronde à ovale, forment des colonies lisses sur agar et ces cellules diploïdes sont souvent hétérozygotes pour le locus MTL (mating type locus) : a/α (Soll 2014). Pour pouvoir se reproduire, la cellule doit subir deux changements. Tout d'abord elle doit devenir homozygote pour le locus MTL, c'est à dire a/a ou α/α , par conversion génique, crossing-over ou perte d'une copie du chromosome 5 (Miller et Johnson 2002). Ensuite, elle doit changer de phénotype et devenir une cellule « opaque » (Morschhauser 2010). Les cellules opaques sont de forme oblongue avec une vacuole géante et une paroi avec des structures particulières semblable à des boutons (**Figure 22**). Différents signaux environnementaux peuvent induire ce processus : la température, des niveaux élevés en O_2 , un stress oxydatif ou encore certaines sources de sucres (Soll 2014).

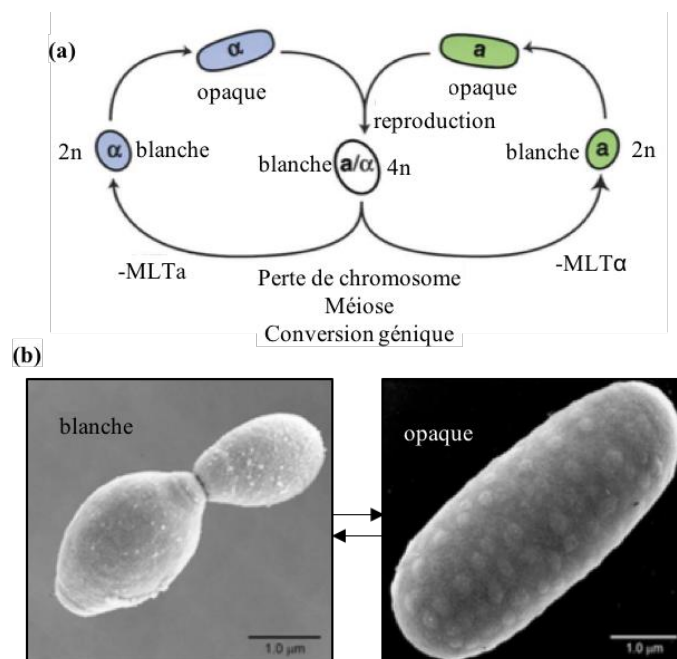


Figure 22 : Transition phénotypique entre cellules « blanches » et « opaques » chez *C. albicans*.

(a) Rôle de la transition blanche-opaque au cours du « cycle sexuel » de *C. albicans* (Miller et Johnson 2002). (b) Microscopie électronique à balayage de cellules blanches et opaques de *C. albicans* montrant leurs différences morphologiques (Soll 2014).

Les cellules blanches et opaques ne sont pas différentes que morphologiquement mais aussi dans leur expression génique et leur métabolisme. Les deux types cellulaires sont capables de filamenter mais expriment des voies de régulation différentes (Si *et al.* 2013). Les cellules opaques ont perdu la capacité de sécréter un important chimioattractant des PNNs, ce qui les rend invisibles pour ces cellules sous certaines conditions (Sasse *et al.* 2013; Geiger *et al.* 2004). Les cellules blanches, elles, sont plus virulentes lors d'infections systémiques chez la souris alors que les cellules opaques sont de meilleures colonisatrices de la peau en model murin (Kvaal *et al.* 1999; Kvaal *et al.* 1997).

Ce phénomène de changement phénotypique permettant la reproduction sexuée a également été mis en évidence chez *C. dubliniensis* et *C. tropicalis* (Porman *et al.* 2013; Pujol *et al.* 2004).

2.7. Formation de biofilm

Les biofilms sont des communautés de microorganismes adhérentes à une surface biotique ou abiotique et entourées par une matrice extracellulaire (Blankenship et Mitchell 2006). Il a été estimé que 80% des microorganismes poussent en communautés sessiles fixées à une surface plutôt que de façon planctonique. De plus une proportion importante (65 à 80%) des infections humaines proviennent de biofilms pathogènes (Bonhomme et d'Enfert 2013). Les biofilms à *Candida* spp. sont donc un problème clinique émergent (**Figure 23a**). L'utilisation courante de dispositifs médicaux tels que les cathéters (urinaire ou centraux), les valves cardiaques, les prothèses... représentent un terrain idéal pour la formation de biofilms (Seddiki *et al.* 2013; Fanning et Mitchell 2012). Dans la plupart des conditions *in vivo*, *Candida* rencontre les différents membres du microbiote humain. Il peut également entrer en contact avec d'autres microorganismes pathogènes. *Candida* doit donc être non seulement capable de résister aux systèmes de défense de l'hôte mais aussi de rivaliser avec d'autres microorganismes pour les sites d'adhésion et les ressources nutritives mais aussi résister aux toxines et produits métaboliques des microorganismes voisins afin de coloniser et survivre au sein de son hôte.

Au sein d'un biofilm, de par les contacts entre cellules et la sécrétion de molécules de signalisation, les cellules adaptent leur comportement pour agir en communauté pluricellulaire (Williams 2007). Les biofilms fongiques sont problématiques en clinique de par leur résistance intrinsèque aux antifongiques communément utilisés et à leur résistance accrue aux forces physiques, aux stress et aux mécanismes de défenses immunitaires

(Chandra *et al.* 2001; Ning *et al.* 2013) . De plus, pour les isolats cliniques de *Candida*, la capacité à former un biofilm est souvent associée à une pathogénicité et une mortalité plus élevée chez les patients atteints de candidémie (Sherry *et al.* 2014). *C. albicans* forme le biofilm le plus résistant même si d'autres espèces (*C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*) forment aussi des biofilms dans les infections humaines (Bonhomme et d'Enfert 2013; Silva *et al.* 2010). D'autres espèces de *Candida* ont également démontré leur capacité à former des biofilms *in vitro* (Silva *et al.* 2011) (**Tableau 4**).

L'efficacité de formation d'un biofilm par *Candida* dépend de la capacité du champignon à former un biofilm, des conditions environnementales (comme la disponibilité en O₂, en nutriments, le niveau de CO₂, le pH), de la texture de la surface (hydrophobicité, rugosité) et de la présence et de l'activité des cellules immunitaires (de Vasconcellos *et al.* 2014; Finkel et Mitchell 2011). La formation d'un biofilm à *Candida* se déroule en plusieurs étapes (**Figure 23b**) :

- l'adhésion qui consiste en l'implantation et l'adhésion d'une cellule seule sur la surface grâce aux adhésines présentes à la surface cellulaire,
- l'initiation lors de laquelle les cellules fixées prolifèrent en micro-colonies puis en une fine couche de cellules qui fournit une base pour le développement du biofilm,
- la maturation : le biofilm prolifère et se développe, ce qui est associé à la formation d'hyphes et/ou de pseudohyphes et à la sécrétion de la matrice extracellulaire (ECM),
- la dispersion : la surface du biofilm mature permet la dispersion et la dissémination de cellules, notamment de type levure (Desai et Mitchell 2015; Finkel et Mitchell 2011).

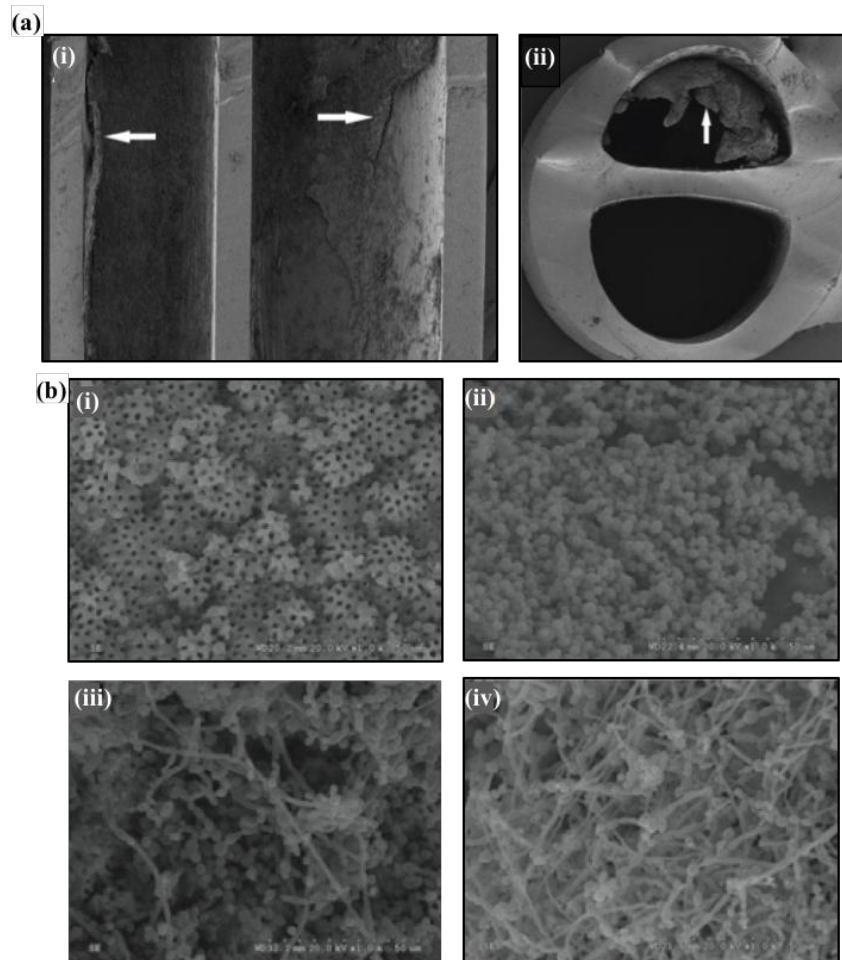


Figure 23 : Biofilm à *Candida*.

(a) Microscopie électronique à balayage (MEB) de coupes (i) longitudinale et (ii) latérale d'un cathéter veineux central. Les flèches indiquent le biofilm à *C. albicans* attaché à la surface interne du cathéter (x35) (Seddiki *et al.* 2013). **(b)** MEB de biofilm à *C. albicans* à différents stades de développement sur du tissu dentaire humain (i) étape d'adhésion, 12h après incubation, (ii) étape d'initiation, 48h après incubation, (iii) étapes de maturation et (iv) de dispersion (x1000) (Ning *et al.* 2013).

Le biofilm « mature » est une structure tridimensionnelle très complexe au sein de laquelle on trouve des microniches avec des conditions particulières où les cellules mettent en place des propriétés spécialisées pour survivre. Par exemple, les cellules qui se situent en profondeur dans le biofilm doivent faire face à des niveaux d'O₂ très faibles (Bonhomme et d'Enfert 2013).

Le quorum sensing

Le quorum sensing est un mécanisme de communication microbien où les microorganismes synchronisent leur comportement en fonction de la densité de la population

(Albuquerque et Casadevall 2012). Cela se fait par la libération de facteurs appelés auto-inducteur ou « quorum sensing molecules » (QSM). La concentration de ces molécules augmente jusqu'à ce qu'un seuil critique soit atteint et permette une réponse intracellulaire (Williams 2007). De plus le quorum sensing joue un rôle important dans la formation de biofilm car il fournit un moyen de communication efficace pour la mise en place, le maintien et la régulation de cette structure multicellulaire complexe (Peleg *et al.* 2010). En 2001, la première QSM décrite chez un organisme eucaryote est le farnésol chez *C. albicans* (Hornby *et al.* 2001) (**Figure 24**).

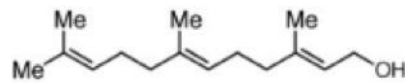


Figure 24 : Structure de la molécule de farnésol.

Le farnésol est un acide isoprénoïde, un produit dérivé de la voie de biosynthèse de l'ergostérol (Nickerson *et al.* 2006). Les principaux effets de cette QSM sur *C. albicans* sont : l'inhibition de la transition de la forme levure à hyphe (Hornby *et al.* 2001), le retour d'une phase de croissance filamenteuse à une forme levure (Lindsay *et al.* 2012) et l'inhibition de l'étape initiale d'adhésion dans la formation de biofilm (Nickerson *et al.* 2006).

Le tyrosol est une QSM importante qui, contrairement au farnésol, stimule la filamentation et la formation de biofilm (Alem *et al.* 2006; Chen *et al.* 2004). D'autres molécules ont été proposées comme QSM ou équivalent, notamment de nombreux alcools aromatiques comme le tryptophol et le phényléthanol (Ghosh *et al.* 2008).

3. Facteur spécifique à l'hôte : l'immunité anti-*Candida*

Le système immunitaire et la flore commensale sont en contact dès les premiers jours de la vie. Une balance très fine est alors mise en place, notamment au niveau des muqueuses pour permettre le développement des microorganismes commensaux au sein de leur hôte. Le moindre déséquilibre peut rompre la balance hôte – microorganisme, et modifier l'interaction qui est alors définie comme pathogène, ce qui peut être le cas de *Candida* spp. Le système immunitaire comprend deux composants majeurs qui sont la résistance, capacité à réguler la

prolifération fongique d'une part, et la tolérance permettant de limiter les dommages induits par un déséquilibre hôte - pathogène d'autre part.

Un des rôles du système immunitaire est la détection suivie de l'élimination des microorganismes qui envahissent les tissus de l'hôte. Le développement et le devenir d'une infection à *Candida* dépendent donc de l'efficacité des mécanismes de défense immunitaire face aux différents facteurs de pathogénicité de *Candida*. Le développement et l'invasion de l'hôte par *Candida* est un phénomène complexe qui a lieu lorsque l'équilibre des barrières naturelles et/ou de l'immunité est rompu (chirurgies à répétition, chimiothérapies suite à un cancer, traitement immunosuppresseur suite à une transplantation d'organe, patients atteints du VIH, traitement antibiotique...). Cela permet une croissance excessive du champignon et sa dissémination pathogène.

Le système immunitaire est constitué de composés cellulaires et humoraux et peut être divisé en deux types de réponses : l'immunité dite innée et l'immunité acquise. La réponse immunitaire face à une infection, se fait *via* un réseau complexe d'interactions impliquant aussi bien les cellules immunitaires spécialisées que des composés humoraux solubles, ce qui permet une connexion entre immunité innée et acquise.

3.1. L'immunité innée vis-à-vis de *Candida*

L'interaction et la reconnaissance entre *Candida* et le système immunitaire de l'hôte se situent à l'interface entre les récepteurs de la membrane des cellules immunitaires et la paroi cellulaire du champignon. Avant de mettre en place une réponse antifongique, le système immunitaire doit reconnaître *Candida*. Cette veille immunologique est faite par les PRRs (Pattern Recognition Receptors) présents à la surface des cellules immunes. Les PRRs reconnaissent et peuvent se lier à différents composés microbiens appelés PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns), qui pour *Candida* sont principalement des constituants de la paroi fongique (Netea *et al.* 2008). Les PRRs sont regroupés en plusieurs familles (**Figure 25**).

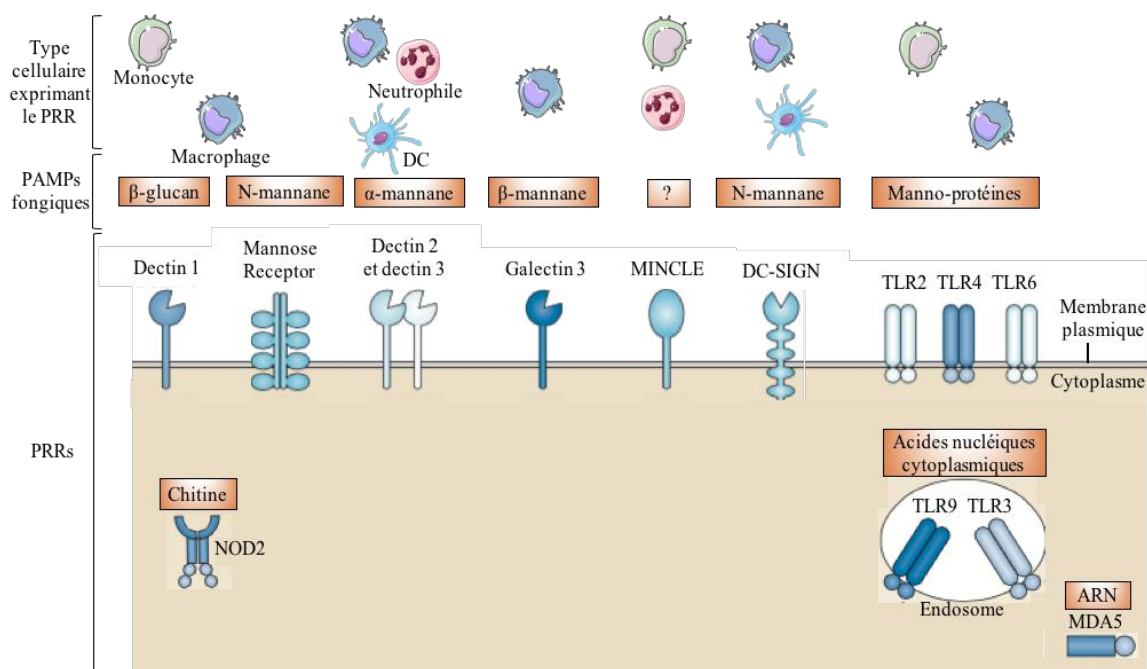


Figure 25 : Reconnaissance de *Candida* spp. par le système immunitaire

Le schéma représente les différents PRRs jouant un rôle dans la reconnaissance de *Candida* ainsi que les types cellulaires les exprimant. Dans les cadres orange sont indiqués les PAMPs fongiques reconnus par les PRR respectifs (d'après Netea *et al.* 2015).

3.1.1. Interactions PAMPs et PRRs

Un grand nombre de données sont obtenues pour l'espèce *C. albicans* qui est largement étudiée en raison de sa prévalence. Toutefois le nombre d'études sur les principales espèces de *Candida*, notamment *C. glabrata*, sont en augmentation (Fidel *et al.* 1999).

Les récepteurs C-type lectin

Les **C-type lectin receptors** ou **CLRs** sont des PRRs principalement membranaires qui reconnaissent les structures polysaccharidiques et présentent une grande importance pour la reconnaissance innée de *Candida* (Netea *et al.* 2008).

Le récepteur le plus étudié de la famille des CLRs est **Dectin-1**. Dectin-1 est exprimé principalement sur les monocytes et les macrophages et reconnaît les β-glucanes exposés au niveau de la paroi des hyphes de *C. albicans* et les β-glucanes « cachés » qui peuvent être exposés au niveau des cicatrices de bourgeonnement chez la forme levure. L'activation de Dectin-1 induit la production de cytokines, telles que l'IL-2 et l'IL-10 (Rogers *et al.* 2005) et l'IL-6 (Slack *et al.* 2007), l'internalisation du champignon, et l'amplification de la réponse

suite à l'activation de TLR2 et TLR4 (Toll-like Receptors). Dectin-1 a également un rôle dans la prévention de la formation des NETs (neutrophil extracellular traps) incontrôlées et donc dans la prévention des dommages tissulaires étendus (Netea *et al.* 2015).

Le **Mannose receptor** (MR) est un autre type de CLR exprimé principalement au niveau des macrophages et reconnaît les N-mannanes de *Candida*, influant l'expression et la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (van de Veerdonk *et al.* 2009).

Dectin-2 reconnaît les α -mannanes et est retrouvé sur les cellules dendritiques, les macrophages et les neutrophiles (Saijo *et al.* 2010). Ce PRR est associé à la production de ROS et permet la phagocytose et la destruction de *C. glabrata* (Ifrim *et al.* 2014). Dectin-2 peut également former un hétérodimère avec Dectin-3 et permettre la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- α) (Zhu *et al.* 2013).

Galectin 3 retrouvé principalement sur les macrophages, reconnaît les β -mannanes (ref 40 Netea 2015) et **MINCLE**, exprimé lui au niveau des neutrophiles et des monocytes, est responsable de l'induction d'une réponse protectrice contre *C. albicans*, principalement par la production de TNF- α (Wells *et al.* 2008).

DC-SIGN (dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin) présent sur les cellules dendritiques et les macrophages, reconnaît lui les N-mannanes. Son activation aide la réponse immunitaire adaptative à se mettre en place par induction de l'expression de cytokines qui permettent l'activation et la différenciation des cellules T (Cambi *et al.* 2008).

Les Toll-like Receptors

Une autre famille de PRRs, les **Toll-like Receptors (TLRs)** qui peuvent être associés à la membrane cellulaire (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 et TLR6) ou bien intracellulaires (TLR3, TLR7, TLR8 et TLR9). Nombreux sont impliqués dans la reconnaissance des composés fongiques : TLR2, TLR4 et TLR6 reconnaissent principalement les mannoprotéines (O-mannanes) de la paroi (Netea *et al.* 2008) ; TLR9 et TLR3 reconnaissent eux les acides nucléiques cytoplasmiques (Nahum *et al.* 2011). TLR2 et TLR4 sont exprimés à la surface des monocytes et des macrophages, mais aussi des cellules dendritiques, des neutrophiles et des lymphocytes T CD4+. TLR6, TLR9 et TLR3 sont retrouvés au niveau des monocytes et macrophages, et pour TLR9 également dans les cellules dendritiques et les T CD4+ (Netea *et al.* 2008).

Les récepteurs RIG-I-like et NOD-like

Les **RLRs**, pour **RIG-I-like Receptors**, forment une famille de PRRs qui reconnaissent les acides nucléiques cytoplasmiques. Bien que connus pour leur rôle dans la détection des virus, une récente étude a mis à jour le rôle de MDA5 (RLR melanoma differentiation-associated protein 5 aussi connu comme IFIH1) comme senseur intracellulaire d'ARN de *C. albicans* (Jaeger *et al.* 2015).

Les **NOD-like Receptors (NLRs)** sont des récepteurs cytoplasmiques avec de nombreuses fonctions biologiques dont notamment l'activation de l'inflammasome. Lors d'infection à *Candida*, les NLRs et principalement NOD2 sont connus pour reconnaître et médier la réponse immunitaire due à la chitine, notamment par la production d'IL-10 (Wagener *et al.* 2014).

L'ensemble de ces PRRs exprimés à la surface des cellules phagocytaires reconnaissent donc des PAMPS (β -glucans, mannanes, monno-protéines, chitine) et sont impliqués dans la transduction de signaux menant à la synthèse de cytokines pro ou anti-inflammatoires et à l'initiation de la phagocytose.

3.1.2. Interactions de *Candida* avec les cellules de l'immunité innée

3.1.2.1. Les neutrophiles

Caractéristiques générales

Les polynucléaires neutrophiles (PNNs) constituent, après les barrières épithéliales (et les lectines circulantes), la première ligne de défense et sont donc d'une importance majeure pour la défense de l'hôte face aux infections à *Candida*. Ce sont des cellules myéloïdes à courte durée de vie, qui lors d'un processus inflammatoire peuvent survivre en moyenne 5,4 jours (Pillay *et al.* 2010). Ces cellules sont présentes dans le sang périphérique et sont constituées d'un noyau polylobé et d'un cytoplasme avec de nombreuses granules (**Figure 26a**) (Faurischou et Borregaard 2003). Les principaux marqueurs membranaires (CD : cluster of differentiation) propres aux neutrophiles sont les CD16, CD32 mais aussi les sélectines CD62L et CD66. Les neutrophiles proviennent de la moelle osseuse, suite à la maturation des myélocytes qui, par pincement, forment les granulocytes matures ou PNNs. La reconnaissance des microorganismes et plus particulièrement des agents fongiques tels que

Candida spp. se fait par des PRRs tels que TLR2, TLR4, Dectin 1 et Dectin 2, mais aussi le CR3 (Complement Receptor) et MINCLE (**Figure 26b**). Sous l'influence de différents stimuli provenant de foyer inflammatoire, les PNNs sont capables de sortir de la circulation par diapédèse (*via* l'émission de pseudopodes) et se dirigent de façon orientée vers leur cible tissulaire. Le rôle de ces cellules est d'éliminer la présence de pathogènes dans le sang et lors d'infections tissulaires notamment par phagocytose, et ce par le biais de mécanismes oxydatifs et non oxydatifs (Reeves *et al.* 2002). Une autre caractéristique spécifique des neutrophiles est le processus de NETose (Neutrophil Extracellular Traps) qui est un mécanisme d'élimination extracellulaire des microorganismes sans phagocytose (Amulic *et al.* 2012; Brinkmann et Zychlinsky 2012).

En ce qui concerne l'étude de l'interaction entre *Candida* spp. et les neutrophiles, un grand nombre de travaux ont été réalisés chez la souris. Toutefois, il est à noter que les résultats obtenus chez la souris doivent être analysés avec prudence car une étude a révélé une capacité réduite des neutrophiles murins à éliminer *C. albicans* par rapport aux neutrophiles humains (Ermert *et al.* 2013).

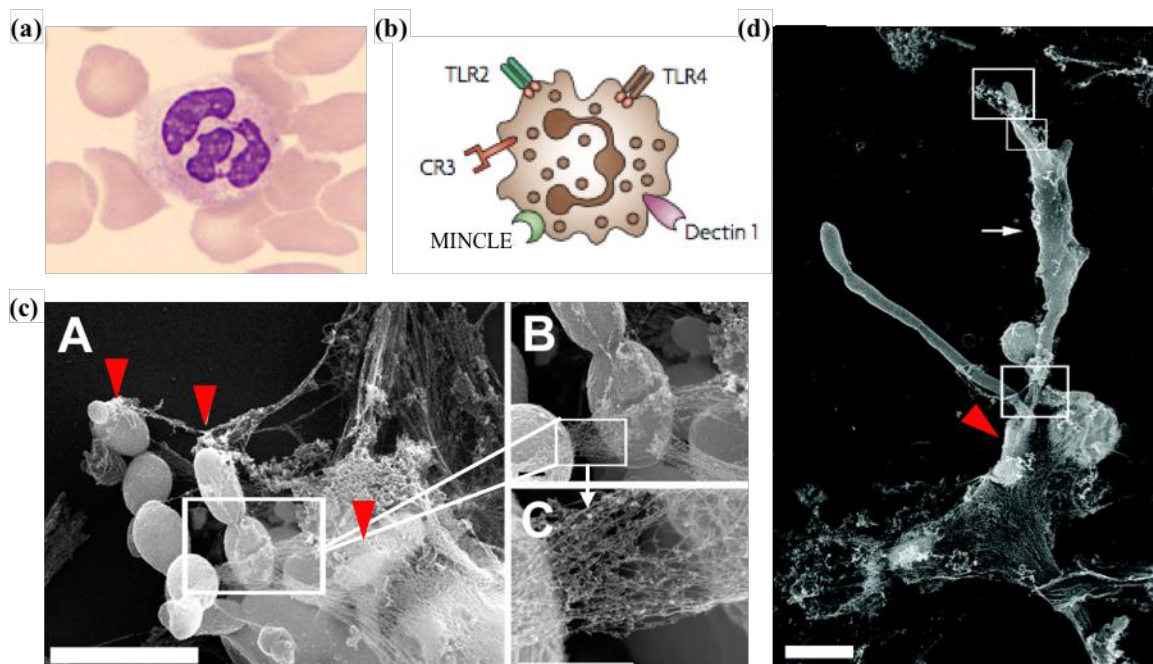


Figure 26 : Interaction entre les neutrophiles et *Candida*.

(a) Polynucléaire neutrophiles, sang normal, coloration May-Grünwald Giemsa, grossissement x1000. (b) PRRs présents sur les neutrophiles et impliqués dans la reconnaissance de *Candida* (Netea *et al.* 2008). (c) Microscopie électronique à balayage (MEB) de levures piégées par des NETs. **A** et **B** : un groupe de levure est recouvert par des NETs et les NETs sont attachés aux levures (triangles rouges). **C** Image en haute résolution

d'une section de NET montrant des fibres avec des domaines lisses et globulaires. Les barres représentent 10 μm . **(d)** MEB d'hyphes piégés par des NETs. Les NETs recouvrent les hyphes (triangle rouge) et un neutrophile entoure un hyphe (flèche). Les barres représentent 10 μm (Urban *et al.* 2006).

Rôle des PNNs dans la défense vis-à-vis des infections à *Candida* chez l'Homme

Le rôle majeur des PNNs dans la réponse anti- *Candida* se base sur des observations cliniques chez l'Homme montrant que la neutropénie (fonctionnelle ou quantitative) est un facteur de risque pour le développement des infections fongiques systémiques causées par différentes espèces de *Candida* (Horn *et al.* 2010; Concia *et al.* 2009; Horn *et al.* 2009; Leroy *et al.* 2009; Abi-Said *et al.* 1997).

L'immunosuppression ainsi que l'immunodépression constituent des facteurs de risque majeur pour le développement de la candidose. Parmi les patients immunosupprimés, certains présentent un risque aggravé si toute fois la neutropénie s'installe. La neutropénie est définie comme un taux anormalement bas de neutrophiles. Des taux inférieurs à 1000 neutrophiles par mL de sang correspond à une neutropénie et des taux inférieurs à 500 neutrophiles par mL, à une neutropénie profonde. Celle-ci peut être dû à des traitements immunosuppresseurs (thérapie anticancéreuse, corticostéroïdes) ou à des pathologies comme les leucémies, le SIDA et le sepsis.

La neutropénie quantitative est induite, notamment par des traitements immunosuppresseurs. Les traitements immunosuppresseurs tels que les inhibiteurs de la calcineurine (FK506, cyclosporine A : CsA), sont utilisés classiquement pour réprimer les populations de lymphocytes T lors d'un conditionnement pré-greffe chez l'Homme. Une étude chez la souris a montré que des populations myéloïdes telles que les PNNs sont également inhibés lors d'un traitement par la CsA rendant les souris susceptibles à la candidose systémique (Greenblatt *et al.* 2010). La neutropénie quantitative peut permettre la dissémination de *Candida* depuis la circulation vers les organes profonds, mais il peut aussi y avoir une translocation de *Candida* de la muqueuse intestinale vers les organes profonds (foie, rate) et une dissémination hématogène (Cheng *et al.* 2014; Haddadi *et al.* 2014; Koh *et al.* 2008). Le syndrome inflammatoire de reconstitution immune (SIRI) est défini par l'aggravation sous forme inflammatoire d'une pathologie, lors de la reconstitution immunitaire après une immunosuppression « réversible » (Sovaila *et al.* 2015). Malgré le manque d'informations physiopathologiques de ce phénomène, l'aggravation a aussi été décrite après introduction d'un traitement anti-infectieux spécifique permettant la levée de

l'immunodépression induite par l'infection elle-même, comme par exemple dans des candidoses systémiques disséminées (Zajac-Spychala *et al.* 2016; Bayram *et al.* 2012; Legrand *et al.* 2008). Ces études ont rapporté des cas de candidoses hépatospléniques suite à un retour rapide à la normale du taux de neutrophiles. Cela suggère que les candidoses hépatospléniques appartiennent aux infections fongiques invasives induisant un syndrome inflammatoire de reconstitution immune chez les patients fragilisés.

La neutropénie fonctionnelle peut être due à des déficits d'activité ou du nombre des neutrophiles en raison de problèmes génétiques. La myéloperoxydase (MPO) est une enzyme présente au niveau des granules azurophiles des neutrophiles et qui métabolise des ROS nécessaires à l'élimination des microorganismes par ces cellules immunitaires. La déficience héréditaire en MPO est le plus courant déficit biochimique des neutrophiles chez l'Homme. Une susceptibilité plus importante aux infections fongiques à *Candida* a été mise en évidence en présence d'un déficit en MPO (Koziol-Montewka *et al.* 2006; Aratani *et al.* 2002; Aratani *et al.* 1999), toutefois la majorité des personnes présentant cette anomalie sont saines. Des défauts dans les voies du stress oxydatif comme dans le cas de la maladie granulomateuse septique chronique provoquent l'apparition de symptômes cliniques dès le plus jeune âge et d'infection récurrentes, notamment fongiques (Aratani *et al.* 2002). Les patients atteints de cette maladie héréditaire sont déficients en NADPH oxydase, enzyme normalement productrice des ROS par les macrophages et neutrophiles, nécessaires à l'élimination des microorganismes. Des souris déficientes en NADPH oxydase infectées avec des levures non viables de *C. albicans* présentent une pneumonie plus sévère que les souris contrôle, ainsi qu'une augmentation de la concentration en cytokines pro-inflammatoires (Endo *et al.* 2017). Une autre classe de défauts génétiques tels que des mutations dans les voies de reconnaissance des microorganismes fongiques (PRRs), notamment Dectin-1, sont associés à une susceptibilité augmentée aux infections à *Candida* (Ferwerda *et al.* 2009; Glocker *et al.* 2009).

Etapes moléculaires impliquées dans la réponse anti-*Candida*

La reconnaissance : D'un point de vue moléculaire la destruction du *Candida* par les PNNs comprend différentes étapes. La reconnaissance de *Candida* par les neutrophiles se fait par le biais de différents récepteurs (PRR), notamment TLR2 et TLR4 qui permettent *via* la sécrétion de cytokines d'orienter la réponse immune (Netea *et al.* 2002), Dectin-1 et Dectin-2 qui induisent eux aussi la production de cytokines (McDonald *et al.* 2012) mais aussi la

phagocytose et le CR3 (Complement Receptor) qui active la phagocytose (Gazendam *et al.* 2016; van Bruggen *et al.* 2009) (**Figure 26b**).

La phagocytose : Les neutrophiles sont décrits comme des cellules phagocytaires plus efficaces que les macrophages pour l'élimination des pathogènes. Ils mettent en place un « burst oxydatif » plus important, qui conduit souvent à leur propre mort. De plus, les granulations présentes dans leur cytoplasme contiennent des substances anti-microbiennes plus variées et plus agressives que les lysosomes macrophagiques. Il semble que les événements physiopathologiques impliqués dans l'activité phagocytaire des neutrophiles induisent des changements cytomorphologiques dans le sang lors de sepsis à *Candida* (La Gioia *et al.* 2016). En ce qui concerne la réponse des neutrophiles face à différentes espèces de *Candida*, il a été montré que plusieurs espèces de NAC, comme *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* et *C. krusei*, sont plus facilement éliminées par les neutrophiles par rapport à *C. albicans* (Brandes *et al.* 2017; Duggan *et al.* 2015a; Linden *et al.* 2010; Roilides *et al.* 1995). Dementhon *et al.* ont montré que *C. albicans* induit plus fortement la mort cellulaire des neutrophiles comparés à *C. glabrata* (Dementhon *et al.* 2012) ce qui suggère que les différences observées peuvent être en partie dues à une capacité accrue de *C. albicans* à tuer les neutrophiles. En effet, des taux de phagocytose plus élevés pour *C. dubliniensis* que pour *C. albicans* ont été associés à une diminution des dommages causés aux neutrophiles ainsi qu'à une augmentation de l'expression des mécanismes d'action antimicrobiens des neutrophiles tels que les ROS et la lactoferrine (Svobodova *et al.* 2012). Dans l'ensemble, il semble clair que les neutrophiles répondent différemment en fonction de l'espèce de *Candida* mais les mécanismes responsables de ces différences sont encore mal compris.

L'activité fongicide est principalement assurée par phagocytose, impliquant une déformation de la membrane plasmique des neutrophiles afin d'englober le pathogène dans une vacuole phagocytaire appelée phagosome. Ensuite, les granules intracellulaires fusionnent avec le phagosome pour constituer un phagolysosome à l'intérieur duquel l'agent pathogène est lysé par une cascade de mécanismes oxydatifs et non-oxydatifs (Faurichou et Borregaard 2003; Mansour et Levitz 2002).

Les mécanismes oxydatifs : Ils regroupent les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS) et composent le « burst oxydatif » qui est déclenché par la phagocytose mais également par l'action de cytokines (Gazendam *et al.* 2016; Tillmann *et al.* 2011; Brown *et al.* 2009). En effet, les neutrophiles présentent une activité plus importante de la NADPH oxydase que les autres cellules phagocytaires. De plus il a été montré que des granulocytes

déficients en NADPH oxydase et en myéloperoxydase (MPO) sont incapables d'éliminer *Candida in-vitro* (Aratani *et al.* 2002).

Les mécanismes non oxydatifs : Ils sont contenus au niveau des granules des neutrophiles et sont également très toxiques pour les pathogènes. Les granules primaires (azurophiles), larges et denses, sont proches des lysosomes et contiennent la myéloperoxydase (MPO) qui participe comme on l'a vu au « burst oxydatif » mais aussi des protéases qui agissent à pH neutre (cathepsine G, élastase, protéinase 3...) (Faurischou et Borregaard 2003). Ces granules sont les premières à fusionner avec le phagosome. Il a été montré que des souris déficientes pour la cathepsine G et l'élastase ont un taux de mortalité plus élevé suite à une infection à *Candida* (Reeves *et al.* 2002). Les granules secondaires elles, sont spécifiques des neutrophiles et contiennent notamment la lactoferrine qui se lie et séquestre le fer nécessaire aux microorganismes et du lysozyme (Amulic *et al.* 2012). Les neutrophiles présentent aussi la capacité de libérer rapidement le contenu de leurs granules ce qui permet une élimination extracellulaire des pathogènes (Becker *et al.* 2015).

La NETose : Les PNNs sont également capables de piéger et d'éliminer les levures et les hyphes de *Candida* sans phagocytose de façon extracellulaire en formant des NETs (Neutrophil Extracellular Traps) qui consistent en de larges structures fibrillaires composées d'ADN, parsemées de plusieurs types de protéines granulaires ayant une activité antifongique, comme la MPO, l'élastase et la calprotectine (Urban *et al.* 2006) (**Figure 26c-d**). La formation des NETs semble particulièrement importante pour limiter la croissance des pseudohyphes que les neutrophiles ne peuvent pas internaliser en raison de leur taille trop importante. Selon les conditions expérimentales utilisées, les mécanismes oxydatifs et non oxydatifs sont tous les deux impliqués dans la mise en place des NETs induits par *Candida* (Kawakami *et al.* 2014; Byrd *et al.* 2013; Metzler *et al.* 2011). Bien que la calprotectine, principal composé des NETs, ait été montré comme ayant une activité antifongique en contrôlant la croissance de *Candida in vivo* et *in vitro* (Urban *et al.* 2009), toutes les molécules spécifiques et indispensables la formation des NETs ne sont pas encore connues. Il semble toutefois que la formation d'un biofilm avec une matrice extracellulaire intacte par *C. albicans* soit capable d'inhiber la formation des NETs mais aussi de supprimer la production de ROS par les neutrophiles (Johnson *et al.* 2016). Récemment, il a été montré que la mise en place de NETs déclenche des modifications de l'architecture de la paroi de *C. albicans* qui améliore sa reconnaissance immunitaire par Dectin-1 notamment (Hopke *et al.* 2016). Cela confirme le concept que les PRRs et les PAMPs aux cours d'une infection sont dynamiques et dépend du dialogue hôte-pathogène.

Induction d'une réponse cytokinique : L'élimination de *Candida* par les neutrophiles peut être directe ou à travers la sécrétion de cytokines et de chimiokines capables d'induire et d'amplifier une réponse inflammatoire sur le site infectieux (Koh *et al.* 2008). Les PNNs étant les premières cellules immunes arrivant au site de l'infection, ils sécrètent des cytokines et chimiokines cruciales dans la mise en place de la réponse inflammatoire et de la réponse immune adaptative. Les cytokines relarguées par les neutrophiles sont souvent synthétisées *de novo*. Contrairement aux autres types cellulaires, les neutrophiles produisent des quantités moindres de cytokines par cellules mais étant donné qu'ils sont très nombreux au site de l'infection, les niveaux finaux de cytokines sont relativement importants (Nathan 2006). La sécrétion initiale de cytokines par les neutrophiles permet d'induire un recrutement cellulaire. La cytokine produite de façon rapide et abondante est l'IL-8 qui permet de recruter d'autres neutrophiles (Scapini *et al.* 2000). Les PNNs produisent également de l'IL-1 β et du TNF- α , des cytokines pro inflammatoires qui activent les autres types cellulaires pour la production de chimio-attractants des neutrophiles (Kasama *et al.* 2005). Il est à noter que le recrutement de PNNs dans les tissus est nettement atténué chez les souris déficientes en IL-17, ce qui lie l'IL-17 à la fonction des neutrophiles (Huppler *et al.* 2014).

Mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse anti-*Candida*

Suite à l'invasion par *Candida*, les neutrophiles sont rapidement recrutés en nombre, notamment au niveau tissulaire, grâce aux cytokines pro-inflammatoires qui induisent leur migration vers le site de l'infection (Zheng *et al.* 2015). Ils sont capables de phagocyter aussi bien les levures que les formes filamentées. Les PNNs sont considérés comme les seuls phagocytes professionnels capables d'inhiber la filamentation intracellulaire de *C. albicans* (Brown 2011). Il a été montré chez la souris qu'un recrutement et une arrivée rapide des neutrophiles au site de l'infection (notamment au niveau du foie et des reins) a un effet protecteur lors de candidoses invasives (Lionakis *et al.* 2011), alors qu'une accumulation tardive des neutrophiles a été montrée comme délétère (Lionakis *et al.* 2012; Majer *et al.* 2012; Romani *et al.* 1997). Une fois *C. albicans* reconnue par les neutrophiles, ces derniers provoquent une augmentation de la production d'IL-6 par les macrophages. L'IL-6 participe à l'induction de la réponse Th17 qui semble importante pour l'immunité antifongique (Hopke *et al.* 2016).

Le rôle des PNNs dans la défense de l'hôte de la candidose disséminée est bien décrit (Koh *et al.* 2008; Hope *et al.* 2007). Cependant, leur rôle dans la défense vis-à-vis de la candidose cutanéomuqueuse reste encore mal élucidé. Il semblerait que la réponse

immunitaire Th17 soit médiée par la sécrétion de peptides antimicrobiens et le recrutement de PNNs (Huppler *et al.* 2014). L'interleukin-17 (IL-17) apparaît comme être un médiateur important dans le recrutement des neutrophiles. En plus des cellules T helper (Th) et des cellules lymphoïdes innées, les neutrophiles ont été eux-mêmes rapportés comme une source d'IL-17 (Becker *et al.* 2015; Taylor *et al.* 2014), ce qui suggère une boucle de rétroaction autocrine dans le recrutement des neutrophiles au site de l'infection (suite à une stimulation avec l'IL-6 et l'IL-23). Bien que des souris étant déficientes dans la voie de signalisation de l'IL-17 soient plus susceptibles aux candidoses invasives, les patients avec une déficience en IL-17 souffrent de candidoses muqueuses mais ne développent pas et ne sont pas plus sensibles aux candidoses invasives. Un modèle murin de candidose oropharyngée a permis de mettre en évidence l'importance du récepteur à IL-1 (IL-1R) dans la protection de la muqueuse orale. En effet, le recrutement des neutrophiles circulant et la mobilisation de nouveaux neutrophiles provenant de la moelle osseuse au site de l'infection sont des processus dépendants de l'IL-1R (Altmeier *et al.* 2016).

Les interférons de type I (IFNs-I) représentent une famille de cytokines connue pour leur régulation de la résistance aux virus, initier les réponses immunitaires innées et adaptatives et moduler la survie cellulaire et l'apoptose. Les principaux membres de cette famille sont l'IFN- β et la famille du INF- α . Leurs rôles dans la protection contre les virus et les bactéries sont clairs, alors que leur contribution au cours des infections fongiques commence à être étudié. Il a été montré que les IFNs-I modifient la réponse hyper-inflammatoire létale au cours des infections systémiques à *Candida* chez la souris (Majer *et al.* 2012) par le recrutement et l'activation des neutrophiles et macrophages inflammatoires vers les organes infectés. C'est la forte abondance de ces cellules qui provoque les dommages tissulaires. Ccr1, un récepteur de chimiokines présent à la surface des neutrophiles, joue un rôle pathogénique dans la candidose invasive chez la souris en influençant l'immunopathologie rénale *via* le recrutement excessif de neutrophiles du sang vers les reins (Lionakis *et al.* 2012).

3.1.2.2. Les monocytes et macrophages

Caractéristiques générales

Les monocytes sanguins ont un noyau volumineux et leur cytoplasme est caractérisé par des expansions cytoplasmiques et par la présence de granules. Leur demi-vie est de 2 à 3 jours dans le sang. Dans le sang il existe 3 phénotypes monocytaires : les monocytes « classiques » expriment les marqueurs CD14⁺ et n'expriment pas CD16⁻ et sont dédiés à la phagocytose (80% des monocytes totaux), les monocytes « non classiques » n'expriment pas le marqueur CD14⁻ ou en des niveaux faibles (CD14^{lo}) et expriment CD16⁺ et ont une fonction dans la réponse inflammatoire (environ 15% des monocytes totaux), enfin les monocytes « intermédiaires » expriment les deux marqueurs CD14⁺ et CD16⁺ et sont transitionnels entre les deux phénotypes précédents (5% des monocytes totaux). Les macrophages proviennent de la différenciation cellulaire de monocytes sanguins. Ils résident uniquement dans les tissus, sont de plus grande taille et présentent un système vacuolaire très développé et de nombreux pseudopodes, ce qui les rend très mobiles. Les macrophages résidents tissulaires présentent une demi-vie longue (plusieurs jours à plusieurs mois) (**Figure 27a**).

Rôle des macrophages dans la défense face aux infections à *Candida*

Chez l'Homme, le rôle des monocytes et des macrophages tissulaires dans la réponse anti-*Candida* a été démontré chez des patients atteints de défauts génétiques surtout fonctionnels, et dans une moindre proportion, quantitatifs, de cette population phagocytaire. En effet, le déficit en MPO affecte également les monocytes et macrophages et rend les patients susceptibles au développement des candidoses invasives. Ce trouble phagocytaire héréditaire est le plus fréquent (fréquence d'environ 1/2000). Les mutations dans le complexe NADPH oxydase affectent tout aussi bien les neutrophiles que les macrophages et confèrent également une susceptibilité à la candidose invasive. Ce déficit génétique est toutefois moins fréquent (1/200 000). De plus, les patients présentant un polymorphisme conduisant à une diminution de la fonction du récepteur de chémokine CX3CR1 des macrophages tissulaires, sont plus sensibles aux candidoses disséminées, alors que leur susceptibilité aux infections à muqueuses à *Candida* n'est pas affectée (Break *et al.* 2015; Ngo *et al.* 2014).

Cependant, il est à noter que la grande majorité des patients déficients en MPO sont asymptomatiques, et que les candidoses invasives ne surviennent que chez les patients atteints de carence complète en MPO et de diabète, associé à un défaut concomitant de la fonction des

PNNs. Par rapport aux PNNs, les monocytes sont moins efficaces dans la réponse initiale à l'infection par *C. albicans* dans le sang périphérique, alors que les macrophages tissulaires sont plus efficaces dans la réponse anti-*Candida* lors de la dissémination dans les organes. Les monocytes sanguins sont également recrutés au niveau des tissus infectés où ils se différencient en macrophages inflammatoires. La pertinence de cette lignée de macrophagique dans la défense anti-*Candida* a été largement étudiée et démontrée par des études *in vitro* et *in vivo* chez des souris. La déplétion en macrophages entraîne alors une prolifération fongique accélérée dans les tissus et une mortalité accrue des souris. Les monocytes murins jouent également un rôle majeur dans la défense anti-*Candida* au niveau des reins (Ngo *et al.* 2014).

En plus des neutrophiles, les macrophages et les monocytes sont des cellules phagocytaires clés pour la protection contre les candidoses invasives car leur déplétion chez la souris infectée augmente la susceptibilité à une infection disséminée à *Candida* (Ngo *et al.* 2014; Lionakis et Netea 2013; Qian *et al.* 1994). Ces derniers sont donc très importants pour les défenses immunitaires innées de l'hôte contre *Candida* en favorisant la survie et l'accumulation dans les tissus des macrophages. Cela est associé à un contact précoce efficace des macrophages avec les levures ainsi qu'un contrôle de la croissance et de l'évasion immune de *Candida* par la phagocytose.

La réponse macrophagique constitue un lien majeur entre la consolidation de l'immunité innée et l'établissement de l'immunité adaptative.

Etapes moléculaires impliquées dans la réponse anti-*Candida*

La reconnaissance de *Candida* : Les macrophages et les monocytes sont munis de nombreux PRRs ; les monocytes expriment de forts niveaux de TLRs et des niveaux modérés de CLR. Après différenciation en macrophages, ils expriment toujours de forts niveaux de TLRs et augmentent l'expression des CLR. Toutefois il est à noter que les niveaux d'expression des PRRs varient chez les macrophages en fonction des cytokines et d'autres facteurs sécrétés au niveau du site infectieux (Netea *et al.* 2015; Netea *et al.* 2008) (**Figure 27b**). Une étude récente a montré le rôle important des macrophages dans le contrôle précoce et le devenir des candidoses systémiques en s'intéressant au récepteur de chémokine « signature » CX3CR1 des macrophages tissulaires (Lionakis *et al.* 2013).

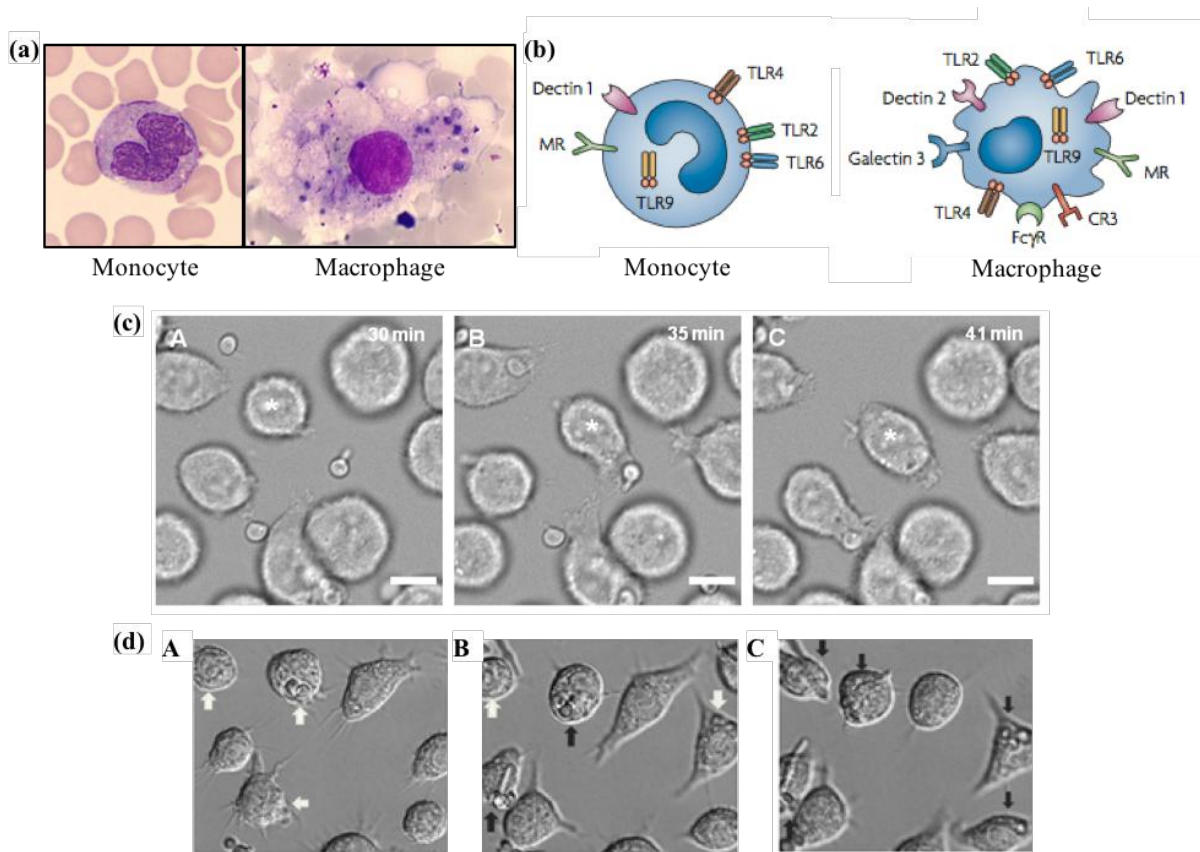


Figure 27 : Interaction des macrophages avec *Candida*.

(a) Monocytes du sang normal et macrophages colorés au May-Grünwald Giemsa. (b) PRRs présents sur les monocytes et les macrophages humains impliqués dans la reconnaissance de *Candida* (Netea *et al.* 2008). (c) Time lapse de l'interaction entre macrophages et *C. albicans*. **A** Le macrophage (*) et la levure de *C. albicans* avant le contact cellulaire, **B** les mêmes cellules au cours du contact macrophage-levure et **C** montrant la levure de *C. albicans* à l'intérieur du macrophage après phagocytose (barre = 10 μ m) (Lewis *et al.* 2012). (d) Co-culture de *C. albicans* et de macrophages (RAW264.7) en RPMI. Time Lapse de l'interaction, **A** après 1h, **B** 2h et **C** après 3h. Les flèches blanches indiquent les levures de *C. albicans* alors que les flèches noires montrent les cellules de *C. albicans* en germination dans les macrophages (Vylkova et Lorenz 2014).

La phagocytose : C'est un mécanisme précoce de la clairance de *Candida*, qui a deux buts : l'inactivation des pathogènes par élimination intracellulaire et, dans le cas des cellules présentatrices d'antigènes, stimulation et coordination de la réponse immunitaire adaptative. Les macrophages phagocytent *Candida* par relargage de substances microbicides (protéases, espèces réactives de l'oxygène, enzymes lysosomales).

La phagocytose en elle-même est particulièrement efficace sur *C. albicans* et cela que les cellules fongiques soient opsonisées ou non (Lewis *et al.* 2012) (**Figure 27c**). Toutefois, la

fixation d'anticorps spécifiques anti-*Candida* à la surface de la paroi fongique favorise la reconnaissance et l'internalisation des levures par les monocytes ou les macrophages (Wellington *et al.* 2003; Marodi *et al.* 1991). Comme les neutrophiles, monocytes et macrophages éliminent efficacement les cellules fongiques invasives et sont rapidement recrutés sur le site de l'infection (Majer *et al.* 2012).

Une fois le pathogène phagocyté, monocytes et macrophages sont capables d'éliminer directement *C. albicans*. Le phagosome alors formé fusionne avec les lysosomes cytoplasmiques pour former le phagolysosome. La maturation du phagolysosome s'accompagne d'une acidification jusqu'à un pH 5 et la levure est alors exposée à l'arsenal antimicrobien oxygène dépendant ou indépendant du macrophage. Les mécanismes oxydatifs, regroupant des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de l'azote (RNS), composent le « burst oxydatif » qui est déclenché par la phagocytose mais également par l'action de cytokines (Brown *et al.* 2009). Les mécanismes non oxydatifs sont activés par l'acidification du phagolysosome. Il y a également libération d'AMP (peptides anti-microbiens) comme les molécules de la famille des défensines qui permettent notamment la formation de pores dans la membrane des pathogènes (Swidergall et Ernst 2014).

Production de cytokines : En plus de l'activation des mécanismes anti-*Candida*, la phagocytose par les monocytes, les macrophages tissulaires et leurs sous-populations permet d'induire la sécrétion de cytokines pour le déclenchement d'une réponse immunitaire pro-inflammatoire Th1 par sécrétion de TNF- α et d'IFN- γ . Cela induit le recrutement et l'activation des autres types de cellules immunes, comme les neutrophiles, au site de l'infection (Netea *et al.* 2015).

Ensuite s'il y a élimination du pathogène, la réaction doit être stoppée par inhibition de la réponse Th1 pour limiter les dommages tissulaires. Cette réorientation anti-inflammatoire est également contrôlée par les macrophages qui sécrètent de l'IL-10 et du TGF- β . Les macrophages sont les principaux producteurs de TNF suite à la reconnaissance des PAMPs. Le TNF induit aussi l'activation des macrophages (Waters *et al.* 2013). En ce qui concerne la cinétique de relargage des cytokines par les macrophages au cours d'infections à *Candida*, il en ressort que celle-ci se fait assez rapidement. Lorsque des macrophages murins sont mis en présence de *C. albicans*, il y a induction de la production d'IL-6, TNF- α et d'IL-10 (Ghosh *et al.* 2010) et ce 6h après le début de l'expérience. Il en ressort toutefois, que suivant les études des concentrations variables de cytokines sont mesurées, cela probablement en raison des différences entre les techniques de mesures et les types cellulaires étudiés.

L'échappement de *Candida* à la phagocytose

Les mécanismes de résistance et d'adaptation de *C. albicans* permettent d'une certaine manière à ce pathogène de contrer les processus d'élimination des pathogènes des macrophages (Brown *et al.* 2014b). De plus, les levures de *C. albicans* phagocytées sont capables de s'échapper des phagolysosomes des macrophages. Cette action se traduit généralement par la mort de la cellule immunitaire. Cette évasion est associée à la formation d'hyphes et requiert la modulation du pH intra-phagolysosomal (Vylkova et Lorenz 2014) (**Figure 27d**). Il a longtemps été cru que les hyphes provoquaient la rupture des macrophages, mais récemment il a été mis en évidence que les levures de *C. albicans* pouvaient aussi déclencher la pyroptosis qui est une voie de mort cellulaire programmée des macrophages qui permet l'échappement de *C. albicans*, la mort du macrophage et le relargage de cytokines pro-inflammatoires (Krysan *et al.* 2014; Uwamahoro *et al.* 2014).

Spécificité de réponse des macrophages et monocytes face aux espèces de *Candida*

Comme pour les neutrophiles, la phagocytose et l'élimination de certaines espèces de NAC plus efficace comparée à celle de *C. albicans*. *C. parapsilosis* est éliminée plus efficacement que *C. albicans*, par un processus qui implique la production de radicaux d'oxygène (Toth *et al.* 2014). *C. glabrata* est aussi phagocyté à un taux plus élevé par les macrophages par rapport à *C. albicans* (Toth *et al.* 2014; Dementhon *et al.* 2012; Keppler-Ross *et al.* 2010). Mais il est intéressant de noter que *C. glabrata* peut survivre et se répliquer au sein des macrophages et être expulsée de la cellule de façon intact (Seider *et al.* 2011). La survie de *C. glabrata* est basée sur une résistance intrinsèque aux stress oxydatif et non oxydatif, ce qui illustre les différences d'interaction entre les cellules immunes et les différentes espèces de *Candida* (Seider *et al.* 2014).

3.1.2.3. Les cellules Natural Killer (NK)

Caractéristiques générales

Les cellules NK (Natural Killer) constituent une population CD3-/CD16+/CD56+ de lymphocytes cytotoxiques connue pour leurs rôles majeurs au cours de infections virales et leur immunité anti-tumorale (Spits *et al.* 2013; Smyth *et al.* 2005). Ces cellules forment une population de lymphocytes innés, représentant 1-10% des lymphocytes sanguins circulants.

La plupart des cellules NK du sang périphérique expriment des niveaux élevés de CD56 (CD56hi). Ce sont des cellules mononuclées ressemblant à de grands lymphocytes granuleux (**Figure 28 a et b**). Ces cellules contribuent à la réponse innée rapide contre les pathogènes de façon indépendante des antigènes, notamment par reconnaissance et induction de la mort cellulaire des cellules infectées. Les cellules NK sont aussi capables de moduler la réponse immune en délivrant des signaux activateurs aux autres cellules immunitaires, notamment les PNNs et les macrophages *via* la sécrétion de cytokines comme l'IFN- γ et le TNF- α (Zucchini *et al.* 2008). La présence de cellules NK permet aussi de réguler la réponse inflammatoire (van Dommelen *et al.* 2006). A la base, les cellules NK ont été principalement identifiées comme ayant un rôle dans la réponse contre les infections virales mais elles ont depuis été identifiées comme d'importants effecteurs dans les infections bactériennes, parasitaires et fongiques (Zucchini *et al.* 2008).

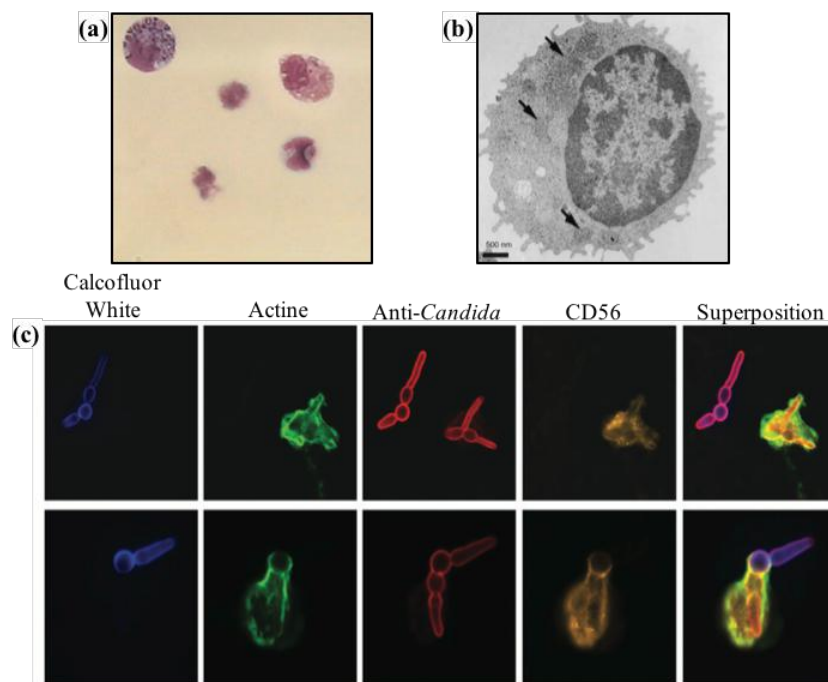


Figure 28 : Interaction de cellules NK avec *Candida*.

(a) Cellule NK, coloration May-Grünwald Giemsa, grossissement x1000 (Valteau-Couanet *et al.* 2002). (b) Cellule NK observée en microscopie électronique à transmission. La barre représente 500 nm et les flèches désignent les mitochondries (Paananen *et al.* 2000). (c) Différentes colorations ont été effectuées : les cellules extracellulaires de *C. albicans* avec du Calcofluor White (bleu), les cellules intra et extra-cellulaires de *C. albicans* en utilisant un anticorps spécifique (rouge). Les cellules NK ont été identifiées comme CD56+ (orange) et leur cytosquelette d'actine identifié en vert. L'image superposant toutes les colorations confirme la phagocytose des cellules fongiques par les cellules NK (grossissement x630) (Voigt *et al.* 2014).

Rôle des cellules NK dans la défense de l'hôte face aux infections à *Candida*

Cette population de cellules a récemment gagné en importance comme population effectrice clé lors de diverses infections fongiques. Les patients atteints de déficits héréditaires en cellules NK ne sont généralement pas plus susceptibles aux candidoses que la population saine. En revanche, les cellules NK humaines ingèrent *C. albicans* par phagocytose et provoquent des réactions pro-inflammatoires (Voigt *et al.* 2014).

Plusieurs récepteurs exprimés à la surface des cellules NK (TLR, le récepteur mannose et le récepteur de Fc) sont capables de reconnaître *C. albicans*. Cependant, le récepteur NKp30 a été récemment montré comme étant leur principal récepteur de la reconnaissance de *C. albicans* (Li *et al.* 2013). Ce mécanisme conduit à l'activation de PI3K et à la sécrétion de perforines. Les cellules NK murines sont capables d'inhiber la croissance de *C. albicans* (Mathews et Witek-Janusek 1998).

Les cellules NK peuvent également avoir une action indirecte sur *C. albicans* via la modulation d'autres cellules immunitaires. Plusieurs cytokines sont ainsi libérées par les cellules NK activées par *Candida*, y compris du GM-CSF et de l'IFN- γ . Leur activité immunomodulatrice peut prolonger l'activation de PNNs ou l'expression de marqueurs d'activation de granulocytes.

Dans un modèle murin de septicémie à *C. albicans* chez des souris immunocompétentes, les cellules NK favorisent une hyperinflammation qui est la cause de la réduction de la survie (Whitney *et al.* 2014). En revanche, chez les animaux immunodéprimés déficients en cellules B et cellules T, les cellules NK se sont avérées bénéfiques dans le recrutement et l'activation d'autres cellules immunitaires, aidant à l'élimination de la levure (Romani *et al.* 1993). De plus, des souris déficientes en cellules T et B et ayant une absence de cellules NK montrent une augmentation de la susceptibilité aux candidoses systémiques alors qu'une absence seule de NK n'augmente pas la susceptibilité (Quintin *et al.* 2014). Les souris avec une déficience combinée en cellules T et NK sont plus susceptibles aux infections fongiques à *C. albicans* alors que la déficience seule en cellules T ne confère aucune susceptibilité (Balish *et al.* 2001).

Les cellules NK peuvent se substituer aux autres populations de cellules T et B en induisant l'activation des cellules phagocytaires et ainsi protéger l'animal d'une infection létale. Une autre étude utilisant des souris déficientes en récepteur d'IL-17 (IL-17RA) et ayant donc une diminution intrinsèque dans le développement de cellules NK fonctionnelles, a permis de montrer le rôle indispensable de cette population cellulaire dans la protection antifongique (Bar *et al.* 2014). En effet, les cellules NK permettent d'amorcer une activité

anti-*Candida* chez les neutrophiles *via* la sécrétion de GM-CSF mais pas par contact direct NK-PNN. De plus, le transfert de cellules NK chez ces souris déficientes est suffisant pour restaurer l'activité fongicide des neutrophiles et pour contrôler la prolifération de *Candida in vivo*.

Etapes impliquées dans la réponse anti-*Candida*

La phagocytose : Les cellules NK humaines sont capables de phagocyter les levures de *C. albicans* (**Figure 28 c**) et de les éliminer mais leur rôle dominant est probablement leur influence sur les autres cellules du système immunitaire *via* la production de cytokines. En effet, la fonction anti-*Candida* des cellules NK se fait aussi bien directement *via* la production de perforines extracellulaires ou indirectement par amorçage de l'activité antifongique des neutrophiles (Voigt *et al.* 2014; Li *et al.* 2013). Il a été observé que le rôle des cellules NK lors d'une infection à *C. albicans* dépend du statut immunitaire global de l'hôte, soit immunocompétent, soit immunodéprimé (Quintin *et al.* 2014).

L'activation des cellules NK par *Candida* résulte en une augmentation de la production d'INF- γ et de TNF- α au cours des candidoses invasives (Quintin *et al.* 2014; Djeu *et al.* 1988). L'INF- γ améliore l'activité anti-*Candida* des macrophages et des PNN et le TNF- α peu augmenter l'efficacité des PNN (Marodi *et al.* 1993; Ferrante 1989; Djeu *et al.* 1986). Par conséquence, une déplétion en cellules NK supprime l'activité phagocytaire des macrophages « spléniques » contre *C. albicans* (Algarra *et al.* 2002; Gaforio *et al.* 2002).

A l'heure actuelle peu de choses sont connues à propos du rôle des cellules NK dans l'immunité face aux différentes espèces de NAC. Toutefois, il semble qu'il n'y ait pas de rôle apparent des cellules T innées et des cellules NK dans la protection contre les infections disséminées à *C. tropicalis*, ceci en se basant sur l'observation que des souris déficientes en cellules T, B, NK et NKT (*Rag2^{-/-}Il2rg^{-/-}*) ne présentent aucune augmentation de la susceptibilité aux infections à *C. tropicalis* (Whibley *et al.* 2015).

Les cellules NK modulent ainsi probablement la réponse immunitaire face à *C. albicans* aussi bien pendant l'infection que lors du commensalisme en coordonnant des réponses complexes et en fournissant une connexion entre immunité innée et adaptative (Ramirez-Ortiz et Means 2012).

3.1.2.4. Les cellules dendritiques

Caractéristiques générales

Les cellules dendritiques représentent une population hétérogène de cellules ayant comme origine des précurseurs médullaires. Deux grands sous-types sont individualisés : les cellules dendritiques myéloïdes (mDC) et les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). Ces cellules sont spécialisées dans la capture, le transport et la présentation d'antigènes vers les lymphocytes T, ce sont donc des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les cellules dendritiques ont un rôle de « patrouilleur » et sont donc présentes dans le sang et dans les tissus en contact avec l'environnement extérieur (comme la peau et les muqueuses) à l'état immature (ex : cellules de Langerhans) (Roy et Klein 2012). En réponse à un pathogène, elles se différencient en cellules matures présentant des dendrites (**Figure 29a**) capables de migration et se dirigent alors vers les organes lymphoïdes notamment où elles déclenchent l'activation des lymphocytes T et leur différenciation en cellules effectrices. Afin de reconnaître *Candida*, les cellules dendritiques possèdent également de nombreux PRRs (Netea *et al.* 2008) (**Figure 29b**) et dont les niveaux varient en fonction de la situation immunitaire (Reizis *et al.* 2011).

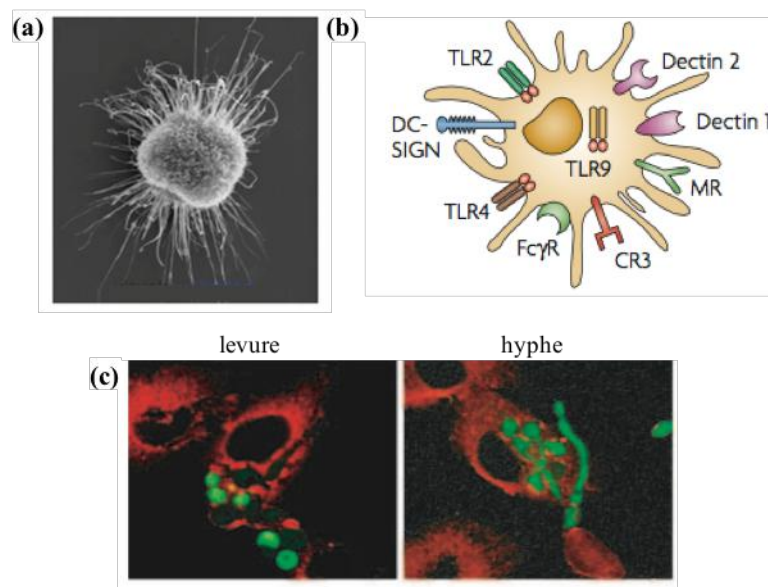


Figure 29 : Interaction des cellules dendritiques avec *Candida*.

(a) Cellule dendritique mature, microscopie électronique à balayage (http://www.msc.univ-paris-diderot.fr/~atef_asnacios/index_fr.html) (b) PRRs présents sur les cellules dendritiques et impliqués dans la reconnaissance de *Candida* (Netea *et al.* 2008). (c) Observation en

microscopie confocale de la phagocytose de levures et d'hyphes de *C. albicans* (vert) par des cellules dendritiques de souris (rouge) (Romani 2004).

Rôle des cellules dendritiques dans la défense vis-à-vis des infections à *Candida*

En plus de leur rôle de CPA, les cellules dendritiques sont également capables de phagocyter et d'éliminer *C. albicans* (**Figure 29c**), ce qui leur permet d'établir en lien entre immunité innée et adaptative. En 2004, Romani a réalisé une étude qui a montré que les cellules dendritiques immatures étaient également capables de phagocyter *C. albicans* sous forme de levure mais aussi d'hyphe. Il semble toutefois que ces cellules soient moins efficaces que les monocytes et les macrophages pour l'élimination de *Candida* (Netea *et al.* 2004), ce qui suggère que le rôle principal de ces cellules reste la présentation d'antigène et la coordination de la réponse immunitaire qui en découle (Ramirez-Ortiz et Means 2012; Newman et Holly 2001).

Une bonne protection contre la plupart des pathogène requiert une immunité adaptative initiée et dirigée par les cellules dendritiques (Hohl *et al.* 2009). L'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques se fait *via* la présentation d'antigène à leur surface mais aussi par leur sécrétion de cytokines (Ramirez-Ortiz et Means 2012; Roy et Klein 2012; Steinman 2012). Un rôle crucial des cellules dendritiques est leur capacité à orienter la réponse immunitaire qui se fait soit en faveur d'un profil tolérogène en présence d'hyphes *via* l'activation des cellules Th1/Treg ou bien en faveur d'un profil inflammatoire en présence de levures *via* l'activation des cellules Th17/Th2 (Bonifazi *et al.* 2009; Romani 2004). Les cellules dendritiques sont donc capables de faire la différence entre les formes morphologiques de *C. albicans* et d'y adapter différents profils cytokiniques et différentes réponses des lymphocytes T (Romani *et al.* 2004; d'Ostiani *et al.* 2000). L'interaction de *Candida* ne se fait donc pas seulement au cours d'une infection mais aussi lors de la colonisation commensale de *Candida* où les cellules dendritiques jouent probablement en rôle important dans la tolérance *in vivo* de *Candida* (Bonifazi *et al.* 2009).

En ce qui concerne la sécrétion de cytokines, la production d'IFN- β par les cellules dendritiques a été montrée comme essentielle pour la réponse de l'hôte face aux infections à *Candida* (del Fresno *et al.* 2013). Les cellules dendritiques produisent des cytokines qui influent sur la différenciation des cellules T helper en réponse à *C. albicans* d'une façon dépendante de la morphologiques de croissance de *C. albicans* et de la sous-population de cellules dendritiques (Kashem *et al.* 2015). La présentation d'antigènes de *C. albicans* et la

sécrétion de cytokines par les cellules dendritiques permet également l'activation des lymphocytes T CD4+ et CD8+ (Ramirez-Ortiz et Means 2012; Beno *et al.* 1995).

Il a longtemps été admis que les cellules dendritiques avaient peu d'effet sur la résistance innée aux infections fongiques. Cependant, une étude récente a montré en utilisant une délétion sélective de Syk (une kinase de cellules dendritiques activées par les CLR) que sa perte rend les souris plus susceptibles aux infections disséminées à *Candida*. Cette étude indique aussi que la coopération des cellules dendritiques avec les cellules NK et les neutrophiles est essentielle pour l'immunité innée protectrice contre *C. albicans* (Whitney *et al.* 2014).

En ce qui concerne les espèces NAC, peu de choses sont connues sur leur interaction avec les cellules dendritiques. Une étude a montré que *C. albicans*, *C. dubliniensis* et *C. glabrata* induisent la production d'INF- β par les cellules dendritiques, avec un taux plus important pour *C. glabrata* (Bourgeois *et al.* 2011). De plus, des différences dans la génération des « fungipodes » (pseudopodes dorsales protrusives) par les cellules dendritiques a également été démontrée entre différentes espèces de *Candida*. *C. parapsilosis* induit une forte induction des « fungipodes » comparée à *C. albicans* et *C. tropicalis* (Neumann et Jacobson 2010).

Les cellules dendritiques de par leur capacité à phagocyter *Candida* et leur rôle de CPA, sont à l'interface entre immunité innée et adaptative dans la réponse face à *Candida*.

3.2. L'immunité adaptative vis-à-vis de *Candida*

Lors d'infections à *Candida*, après initiation de la réponse immunitaire innée, une réponse secondaire, aussi appelée immunité adaptative ou spécifique est rapidement mise en place pour permettre une immunité efficace et durable. Celle-ci comporte deux types de réponses, une dite à médiation cellulaire dont les principaux acteurs sont les lymphocytes T et B ainsi que les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) et une seconde dite humorale caractérisée par les anticorps spécifiques sécrétés par les plasmocytes. L'immunité anti-*Candida* est basée sur la coopération entre immunité innée et adaptative à médiation cellulaire où les monocytes (CPA) et les lymphocytes T jouent un rôle primordial dans des proportions propres aux différents sites d'infection (Dongari-Bagtzoglou et Fidel 2005).

3.2.1. Les lymphocytes T

Les lymphocytes T sont des composés importants de la réponse immunitaire adaptative de l'hôte face aux infections à *Candida* et fournissent un moyen de contrôler directement et indirectement la prolifération fongique. Les T CD4+ (cellules T helper) (**Figure 30a**) ainsi que les T CD8+ (cellules T cytolytiques) ont été montrés comme jouant un rôle dans l'immunité antifongique et ont une activation contrôlée par les cellules dendritiques mais aussi par les neutrophiles en tant que CPA lors d'infections à *Candida* (Ramirez-Ortiz et Means 2012; Sandilands *et al.* 2005). Bien que les T CD8+ soient capables d'inhiber la croissance des hyphes de *C. albicans in vitro* (Beno *et al.* 1995), le principal mécanisme d'initiation de la réponse immunitaire adaptative s'effectue par présentation d'antigènes fongiques par les cellules dendritiques aux T CD4+ naïfs, ce qui génère une réponse de type T helper (Th).

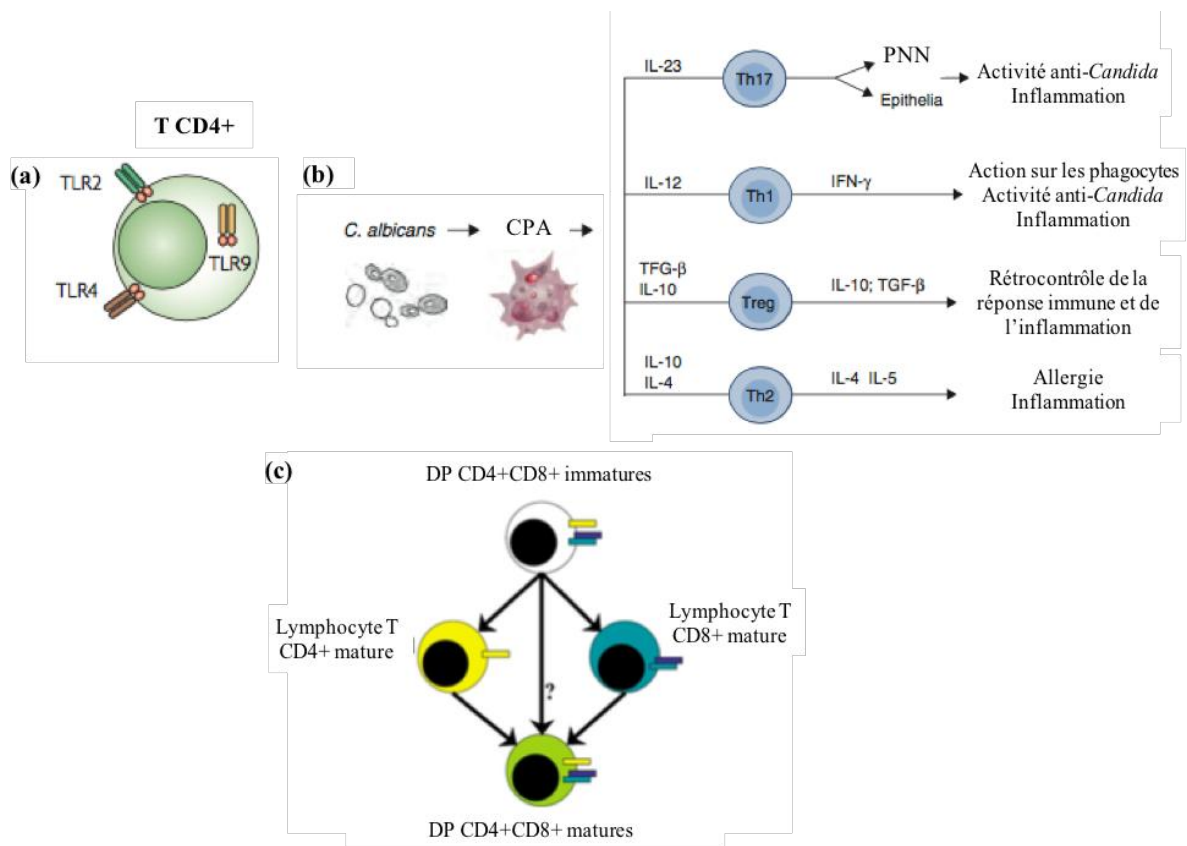


Figure 30 : Interaction des lymphocytes T avec *Candida*.

(a) PRRs présents sur les T CD4+ et impliqués dans la reconnaissance de *Candida* (Netea *et al.* 2008). **(b)** Représentation schématique de la réponse anti-*Candida* et de la régulation des lymphocytes T. Seulement les principales cytokines régulatrices sont indiquées (Cassone et Cauda 2012). **(c)** Schéma représentant l'origine des cellules DP CD4+CD8+ (Parel et Chizzolini 2004).

Il existe 4 sous catégories de réponses T helper : Th1, Th2, Th17 et Treg. La mise en place de chacune des sous catégories est dictée par les cytokines et l'environnement proche présents au moment où les cellules T CD4+ naïves sont activées par les CPA (Ramirez-Ortiz et Means 2012). De plus, les cytokines qui conduisent à la différenciation de chaque phénotype Th sont des inhibitrices du développement des autres réponses, ce qui maximise les chances qu'un seul type de réponse Th soit initié à un moment donné. Ce phénomène, aussi appelé « polarisation » de la différenciation Th, a un impact important sur le devenir de la réponse adaptative et est dépendant des cytokines présentes dans le milieu.

La protection contre les candidoses orales et cutanées est plus particulièrement associée à l'immunité spécifique Th17, alors que les deux réponses Th1 et Th17 participent à la protection contre les infections systémiques à *Candida* (Romani *et al.* 2015; Hernandez-Santos *et al.* 2013; Conti *et al.* 2009; Huang *et al.* 2004). Contrairement aux phénotypes protecteurs Th1/Th17, l'induction d'un phénotype Th2 est très souvent associée à une augmentation de la croissance et de la dissémination fongique (Richardson et Moyes 2015) (**Figure 30b**).

Lymphocytes T CD4+ et CD8+

L'importance de la mise en place d'une réponse T helper dans la protection immunitaire à *C. albicans* a été mise en évidence par la prévalence des candidoses oropharyngées (OPC) chez les patients VIH+ chez lesquels le taux de lymphocytes T CD4+ est diminué (Cassone et Cauda 2012; Fidel 2011; de Repentigny *et al.* 2004). En effet, la corrélation entre infections buccales à *C. albicans* et VIH est telle que la présence d'une OPC est maintenant considérée comme un signe fiable d'un taux diminué en T CD4+. Il est également à noter que les patients VIH+ n'ont pas seulement un taux de T CD4+ réduit mais présentent aussi une perte de cellules Th17 (Klatt et Brenchley 2010; Brenchley *et al.* 2008).

L'importance des cellules T CD4+ dans la réponse à *C. albicans*, et plus particulièrement des cellules Th17, a été montrée chez des souris KO et des humains présentant des mutations de la voie IL-17. En effet, de nombreuses déficiences (CARD9, IL-17RA, IL-17RC, IL-17A, STAT3) augmentent la susceptibilité à diverses infections à *C. albicans*, donc les candidoses orales, cutanées et disséminées (Milner et Holland 2013). Toutefois les T CD4+ ne possèdent pas d'activité cytolytique directe contrairement aux T CD8+.

Bien que les cellules T CD8+ ne soient pas considérées comme primordiales dans la défense de l'hôte face à *Candida*, il a été montré chez des patients VIH le recrutement de

cellules T CD8+ mémoires activées (Myers *et al.* 2003). Celles-ci se trouvant à bonne distance du site d'infection, il semble qu'un dysfonctionnement au niveau du microenvironnement empêche la migration de ces cellules au niveau du site de l'infection, notamment un faible taux de E-cadhérine qui facilite la migration des cellules au niveau des muqueuses (Quimby *et al.* 2012).

Spécificité de réponse de lymphocytes T face aux espèces NAC

L'existence d'un rôle des cellules T CD4+ dans l'immunité face aux espèces NAC existe également. Une étude de cas clinique portant sur un sepsis causé par *C. parapsilosis* chez une enfant atteinte de dysplasie ectodermique et d'une hypoplasie thymique a été associée à un nombre réduit de cellules T et une capacité de prolifération de ces cellules réduite (Brooks *et al.* 1994). En réponse aux différentes espèces de *Candida*, les cellules T peuvent avoir des réactions croisées ou bien être spécifiques. Les cellules T humaines générées suite à une stimulation avec des extraits cellulaires de *C. albicans* présentent une réaction croisée avec *C. tropicalis* mais pas avec *C. glabrata* (Tramsen *et al.* 2007). Malgré la génération d'une réponse T CD4+ avec une spécificité distincte, il semble que l'induction d'IL-17A par les cellules T CD4+ est une caractéristique commune à de nombreuses espèces de *Candida*. *C. albicans* et *C. dubliniensis*, qui sont étroitement liées phylogénétiquement, induisent de fort taux d'IL-17A alors que *C. glabrata*, une espèce plus éloignée, en induit aussi mais a des taux moindres (Bar *et al.* 2012). Etant donné le rôle protecteur de l'IL-17 dans l'immunité contre *C. albicans*, il semblerait logique qu'elle ait la même importance pour la lutte contre les autres espèces de *Candida*. Toutefois, dans un modèle murin de candidose disséminée à *C. tropicalis*, la réponse dépendante de l'IL-17 n'est pas indispensable pour la protection contre l'infection (Whibley *et al.* 2015). Donc l'immunité IL-17 est générée vis-à-vis de seulement certaines espèces de *Candida*.

Lymphocytes T double positifs CD4+ CD8+

L'expression du CD4 et des co-récepteurs CD8 $\alpha\beta$ sur les cellules T matures est généralement considérée comme étant exclusive, reflétant des fonctions spécifiques du sous ensemble (helper VS cytolytique) et marquant des différences de restriction du complexe d'histocompatibilité pour la reconnaissance d'antigènes. Toutefois, des cellules T double positives (DP) qui expriment aussi bien le CD4 que le CD8 (**Figure 30c**), ont été décrites dans plusieurs conditions pathologiques mais aussi chez des individus sains. Les lymphocytes T double positifs CD4+CD8+ (DP CD4CD8) représentent une population hétérogène dans

l'expression des molécules de CD4 et CD8 qui est subdivisée en 3 sous populations : CD4hiCD8lo qui expriment de forts niveaux de CD4 et une expression CD8α habituellement faible, CD4loCD8hi qui expriment des niveaux bas de CD4 et avec un signal d'expression CD8αβ fort et CD4hiCD8hi qui expriment de forts niveaux de CD4 et de CD8αβ (Parel et Chizzolini 2004).

Dans le sang périphérique humain, les cellules DP CD4CD8 sont relativement peu fréquentes, représentant une proportion de 1 à 3 % des lymphocytes CD3+ (Giraldo *et al.* 2011; Nascimbeni *et al.* 2011) et les CD4hiCD8lo est la sous population la plus fréquente (Macchia *et al.* 2006). Les cellules T DP CD4+CD8+ sont présentes chez différentes espèces et ont été caractérisées comme cellules effectrices ayant un rôle important dans la régulation de la réponse immune (Zuckermann 1999). Les DP CD4+CD8+ intestinales sont décrites comme des cellules mémoires fortement activées présentant une capacité accrue à produire des cytokines (Pahar *et al.* 2006).

Les CD4loCD8hi représentent une petite sous population qui peut être présente dans le sang périphérique des sujets sains. Des études ont également mis en évidence que la fréquence des CD4loCD8hi augmente chez les patients atteints d'infections virales ou parasitaires chroniques et de maladies auto-immunes (Giraldo *et al.* 2011; Nascimbeni *et al.* 2011; Martinez-Gallo *et al.* 2008; Parel *et al.* 2007). Cette sous-population cellulaire semble avoir une plus grande capacité à produire des cytokines Th2 et participe à la régulation immune par production d'un profil cytokinique original (IL-2, IL-4, IL-13, TNF-α, IFN-gamma et GM-CSF).

En ce qui concerne les infections à *Candida*, une étude a montré une augmentation des lymphocytes T DP CD4+CD8+ suite à une inoculation vaginale de *C. albicans* chez des souris (traitées ou non avec des estrogènes) (Ghaleb *et al.* 2003). Paulovicova *et al.* (2007) ont également mis en évidence que l'immunisation de lapins avec un conjugué mannan-HSA (human serum albumin) extrait de *C. dubliniensis* induit une augmentation significative des CD4+CD8+ (Paulovicova *et al.* 2007). Cependant les fonctions et les caractéristiques phénotypiques de cette population cellulaire spécifique de DP CD4+CD8+ au cours des candidoses reste inconnues.

3.2.2. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B représentent environ 5 à 15% des lymphocytes du sang circulant (**Figure 31a**) et sont caractérisés par la présence d'immunoglobuline (Ig) ou anticorps à leur surface. Ces immunoglobulines sont produites par le lymphocyte B lui-même et jouent le rôle de récepteurs spécifique à l'antigène (BCR : B cells receptor).

Les Ig (anticorps) sont des hétérodimères protéiques composés de deux chaînes semblables lourdes H (heavy) et de deux chaînes identiques légères L (light). Chaque chaîne est composée d'une région C constante et d'une région V variable. C'est l'association des domaines V des chaînes H et L qui définit le site de fixation de l'antigène (**Figure 31b**).

Les lymphocytes B après activation se transforment en plasmocytes qui sécrètent des immunoglobulines (anticorps) de la même spécificité que leur BCR.

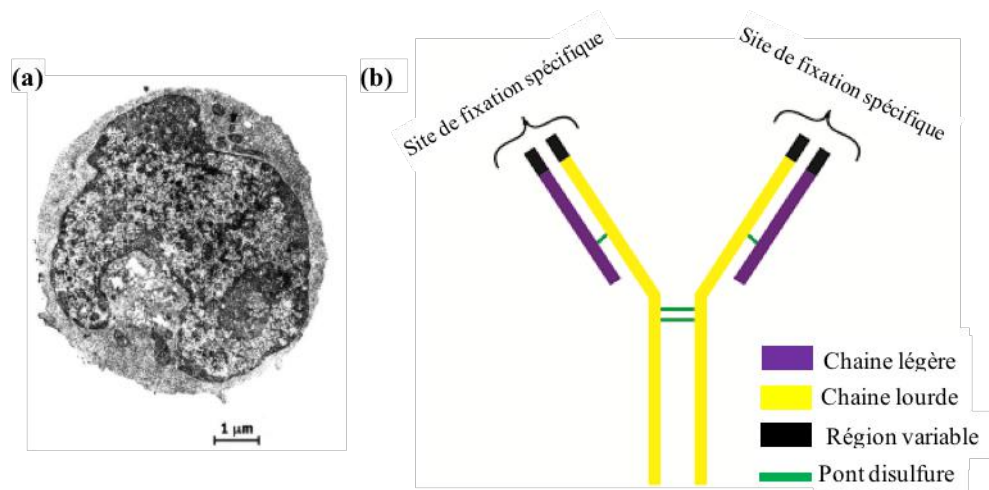


Figure 31 : Lymphocytes B.

(a) Lymphocyte B en microscopie électronique. La barre représente 1 µm. (b) Structure schématique d'une immunoglobuline (anticorps).

La production d'anticorps correspond à la partie finale de la réponse immunitaire adaptative. Pendant de nombreuses années, le rôle de l'immunité médiée par les anticorps dans les défenses antifongiques a été controversé (Casadevall 1995). Cependant, ces dernières années des recherches ont mis en évidence que l'immunité médiée par les anticorps constitue une arme importante dans les défenses antifongiques de l'hôte (Casadevall et Pirofski 2012, 2007). Les anticorps sont capables de mettre en place plusieurs effets différents, aussi bien protecteur que non, mais aussi pathogénique.

Les principaux mécanismes de l'immunité médiée par les anticorps dans l'immunité antifongique incluent l'opsonisation, l'activation du complément et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC : antibody dependent cellular cytotoxicity) (Casadevall et Pirofski 2011). De nombreuses études ont maintenant démontré que les anticorps peuvent protéger contre les infections à *Candida* et un certain nombre d'anticorps monoclonaux ou de fragments d'anticorps (Fabs) ont été décrits pour *C. albicans* (Sandini *et al.* 2011; Torosantucci *et al.* 2009; Moragues *et al.* 2003).

Plusieurs motifs cibles des anticorps sont présents au niveau de la paroi de *C. albicans* (polysaccharides, protéine et glycolipides). Les anticorps agissent donc probablement en perturbant ou interférant avec les processus pariétaux, en modifiant la dynamique ou en remodelant la paroi de *C. albicans* (Lopez-Ribot *et al.* 2004), en ciblant par exemple les β -glucanes (Torosantucci *et al.* 2005). Certains de ces anticorps affectent directement l'interaction hôte-*Candida* via l'inhibition de la formation de biofilm (Martinez et Casadevall 2005), la croissance fongique (Torosantucci *et al.* 2005), la formation d'hyphes (Moragues *et al.* 2003) mais aussi les processus d'acquisition de nutriments (fer, zinc) (Brena *et al.* 2011).

Les lymphocytes B et les anticorps ont donc un rôle dans la protection et l'immunité adaptative face aux infections à *Candida*. Leur rôle lors des infections systémiques reste toutefois à explorer.

Chapitre IV : Le granulome à *Candida*

Face à la grande variété des agressions (traumatisme, nécrose cellulaire, infection) que peuvent subir les tissus, ceux-ci répondent presque toujours par une réaction inflammatoire. Le but de cette réaction est de détruire ou de contenir l'agent responsable des dégâts, d'initier le processus de réparation et/ou d'immunité et de rendre au tissu lésé son intégrité et sa fonction initiale.

On distingue l'inflammation aiguë et chronique. Les agressions tissulaires provoquent généralement une réaction inflammatoire aiguë. Toutefois, certaines lésions (infections virales ou fongiques, corps étrangers) peuvent provoquer une réaction inflammatoire chronique. Une inflammation aiguë peut se résoudre et/ou aboutir à une cicatrisation, mais elle peut aussi évoluer vers une inflammation chronique et il est fréquent d'observer les deux processus de façon simultanée.

Les principales caractéristiques de l'inflammation chronique sont la persistance de la lésion tissulaire due aux cellules inflammatoires de l'infiltrat, la présence d'un infiltrat inflammatoire chronique et parfois l'existence d'une fibrose.

Il existe plusieurs types d'inflammation chronique dont :

- l'inflammation chronique non spécifique, qui fait suite à une inflammation aiguë non résolue ;
- l'inflammation chronique spécifique qui survient d'emblée en réponse à certains types d'agression ;
- l'inflammation granulomateuse, qui est un sous type d'inflammation chronique spécifique caractérisée par présence de granulomes.

Une inflammation granulomateuse repose en partie sur l'activation des macrophages qui régulent la réponse inflammatoire chronique. Ces cellules peuvent être activées par des stimuli immuns ou non immuns. Une fois activés, les macrophages possèdent des capacités de phagocytose et de destruction mais sécrètent aussi une grande variété de facteurs (cytokines) qui contrôlent le mode d'action des autres types cellulaires inflammatoires qui permet la mise en place de la réponse granulomateuse.

1. Le granulome

1.1. Définition

La réponse granulomateuse est reconnue comme une entité physiopathologique distincte depuis le début du 19^{ème} siècle. Toutefois, il reste difficile de définir précisément un granulome. Il est souvent décrit comme une réponse inflammatoire caractérisée par la présence de lymphocytes et monocytes évoluant en une réaction identifiée par la présence de phagocytes mono et multi-nucléaires incluant des cellules épithélioïdes et multinucléées géantes.

Adam, en 1976 décrit le granulome tel que : « un granulome est un ensemble compact et organisé de phagocytes mononucléaires matures (macrophages et / ou cellules épithélioïdes) qui peuvent être ou non accompagnés par des caractéristiques accessoires telles qu'une nécrose ou une infiltration d'autres types de leucocytes inflammatoires » (Adams 1976).

Un granulome, tel que défini ci-dessus, est une réponse inflammatoire de type non-spécifique qui peut être initiée par divers agents antigéniques ou par des corps étrangers inertes. Les agents antigéniques déclenchants provoquent une activation du système immunitaire cellulaire (lymphocytes T, macrophages et neutrophiles) et les granulomes sont formés comme le résultat de l'interaction complexe des cytokines produites par ces cellules. Les agents antigéniques déclenchants incluent une grande variété d'agents infectieux (bactéries, mycobactéries, virus, agents fongiques) ainsi que d'autres antigènes (le béryllium, l'agent inconnu de la sarcoïdose). Les réactions granulomateuses à corps étrangers inertes sont généralement considérées pour être d'origine non immunologique.

1.2. Développement du granulome

L'initiation de la formation d'un granulome, excepté pour les granulomes à corps étranger inertes, semble être le dépôt au sein d'un tissu, d'un agent antigénique particulièrement « indigeste » qui initie une réaction d'hypersensibilité de type IV dite retardée ou à médiation cellulaire (Kobayashi *et al.* 2001a). Les mécanismes de dégâts tissulaires de l'hypersensibilité retardée mettent en jeu des lymphocytes T et des monocytes et/ou macrophages. Les cellules T cytotoxiques (Tc) causent des dommages directs, tandis que les cellules T helper sécrètent des cytokines qui activent les cellules T cytotoxiques et

recrutent et activent les monocytes et les macrophages, qui provoquent la majeure partie des dégâts.

L'interaction complexe entre les cellules présentatrices d'antigène (CPA) et les lymphocytes T, médiée par une variété de cytokines, résulte initialement en une prolifération des lymphocytes T et leur activation aux sites de fixation de l'antigène. Les lymphocytes T sont préférentiellement des lymphocytes T helper.

Le recrutement des macrophages à partir de la circulation, leur attraction et rétention sur le site de dépôt de l'antigène, leur maturation en cellules épithélioïdes et la formation finale d'un granulome mature à lieu sous l'influence de cytokines produites par les cellules T CD4+ activées.

Par ailleurs, les différents types de granulomes associent en proportion variable des éléments mononuclés tels que des macrophages, lymphocytes et histiocytes mais aussi des cellules de type histiocytaires spécifiques qui peuvent être de deux types.

Les cellules épithélioïdes sont des macrophages ayant un aspect rappelant celui des cellules épithéliales. Cet histiocyte spécifique est une cellule allongée, à limites imprécises. Son cytoplasme est abondant et faiblement éosinophile. Son noyau peut être arrondi, ovalaire ou en forme de sablier, possède un nucléole qui peut être visible. L'aspect pseudoépithélial résulte de l'agencement nodulaire ou palissadique de ces cellules (**Figure 32a**).

Les cellules géantes multinucléées sont fréquemment présentes dans les granulomes. Toutefois, les granulomes peuvent ou non contenir ces cellules. Quelques granulomes ne sont formés que de ces cellules alors que d'autres en sont totalement dépourvus. Les cellules multinucléées géantes qui sont présentes dans les granulomes, sont traditionnellement classées comme étant des cellules de Langhans ou des cellules de Müller. Les cellules Langhans sont caractérisées par la localisation de leurs noyaux à la périphérie de la cellule en couronne ou en forme de fer à cheval (**Figure 32b**). Elles proviennent de la fusion de cellules épithélioïdes ou de la multiplication de leurs noyaux sans division cytoplasmique. Ce sont de grandes cellules à bords nets avec un cytoplasme très abondant et éosinophile. Les cellules de Müller sont des macrophages très volumineux qui présentent plusieurs noyaux qui sont répartis au centre (**Figure 32c**). Quelques cellules multinucléées géantes ont les caractéristiques des deux types cellulaires. La signification des variations de morphologie de ces cellules est inconnue. Ces cellules conservent la capacité phagocytaire qui est toutefois moindre que celle des monocytes et macrophages.

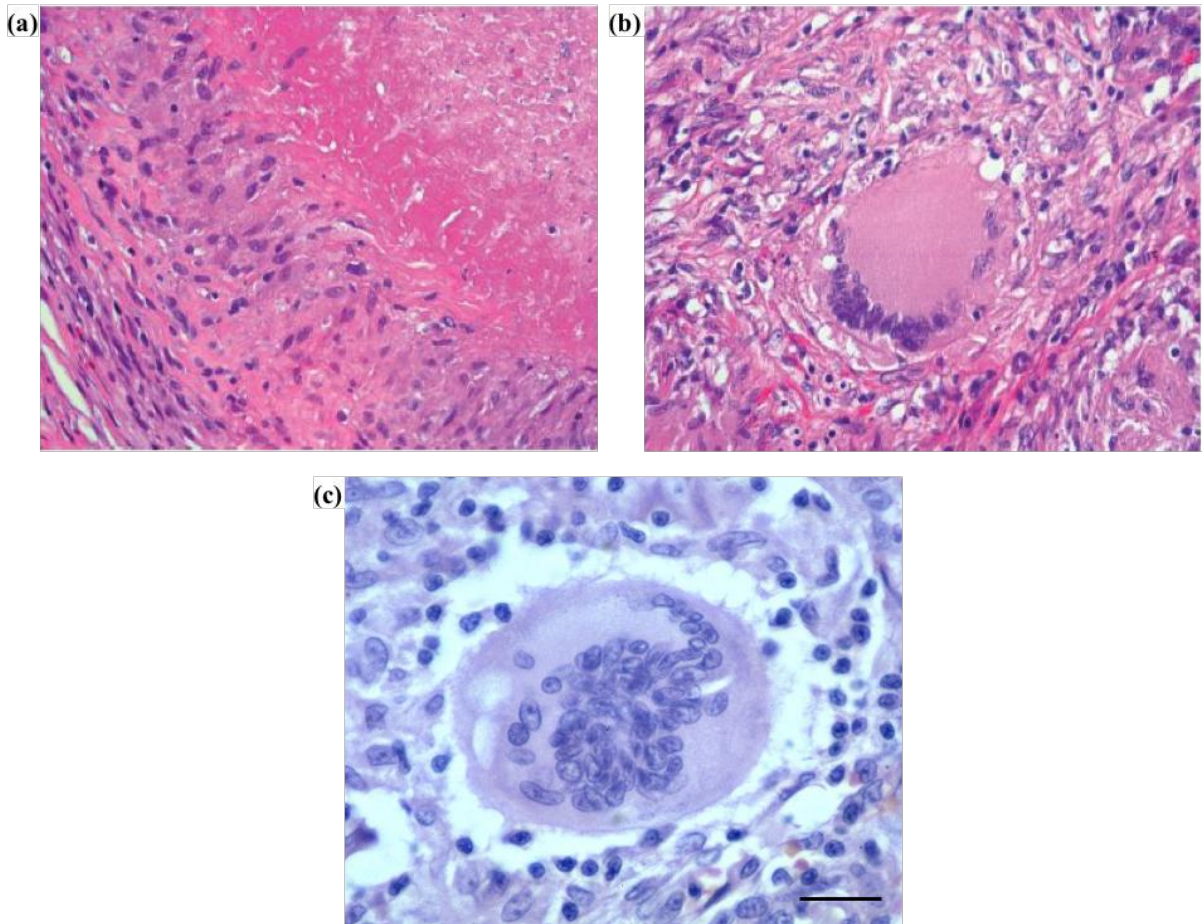


Figure 32 : Les cellules spécifiques du granulome

(a) Cellules épithélioïdes disposées de façon palissadique. (b) Cellules multinucléées géantes de type Langhans. (c) Cellules multinucléées de type Müller. La barre représente 20 μm .

(<http://granuloma.homestead.com/index.html>).

1.3. Histopathologie des granulomes

1.3.1. Granulomes épithélio-giganto-cellulaires avec ou sans nécrose

Ces granulomes épithélio-giganto-cellulaires sont des formations nodulaires grossièrement arrondies et assez volumineuses (100 à 200 μm de diamètre). Ils sont constitués de plusieurs couches cellulaires concentriques. On peut trouver au centre une ou plusieurs cellules géantes, entourées de cellules épithélioïdes qui sont elles aussi entourées par un anneau de lymphocytes. On peut parfois trouver des fibres conjonctives entourant cet amas cellulaire.

Les granulomes épithélio-giganto-cellulaires sans nécrose (**Figure 33a**) sont aussi appelés follicule tuberculeux si l'étiologie tuberculeuse est certaine, ou tuberculoïdes dans le cas contraire. Ils peuvent aussi survenir en même temps que des granulomes avec nécrose lors

d'infections comme la tuberculose et être retrouvés lors de biopsies. La découverte d'un granulome sans nécrose ne doit pas exclure une étiologie infectieuse. En effet, on les retrouve notamment dans la sarcoïdose, la maladie de Cröhn, la lèpre, les schistosomiasis mais aussi certaines mycoses.

Les granulomes épithélio-giganto-cellulaires avec nécrose (**Figure 33b**) sont caractéristiques de maladies infectieuses comme la tuberculose et certaines infections fongiques mais aussi de la granulomatose de Wegener et de granulomes nécrobiotiques post-chirurgical. La nécrose, minime et focale, peut aussi être observée dans des granulomes de sarcoïdose. Ces formations nodulaires sont de tailles variables au centre de laquelle se trouve une zone de nécrose éosinophile, acellulaire. Plus ou moins étendue, cette zone de nécrose peut varier de quelques millimètres à plusieurs centimètres, et est entourée d'une couche de cellules épithélioïdes et de cellules géantes de Langhans d'épaisseur variable pouvant parfois prendre un aspect palissadique. La couche la plus externe est formée de lymphocytes.

L'utilisation des termes « caséux » et « non-caséux » pour décrire l'apparence microscopique de ces granulomes est courante.

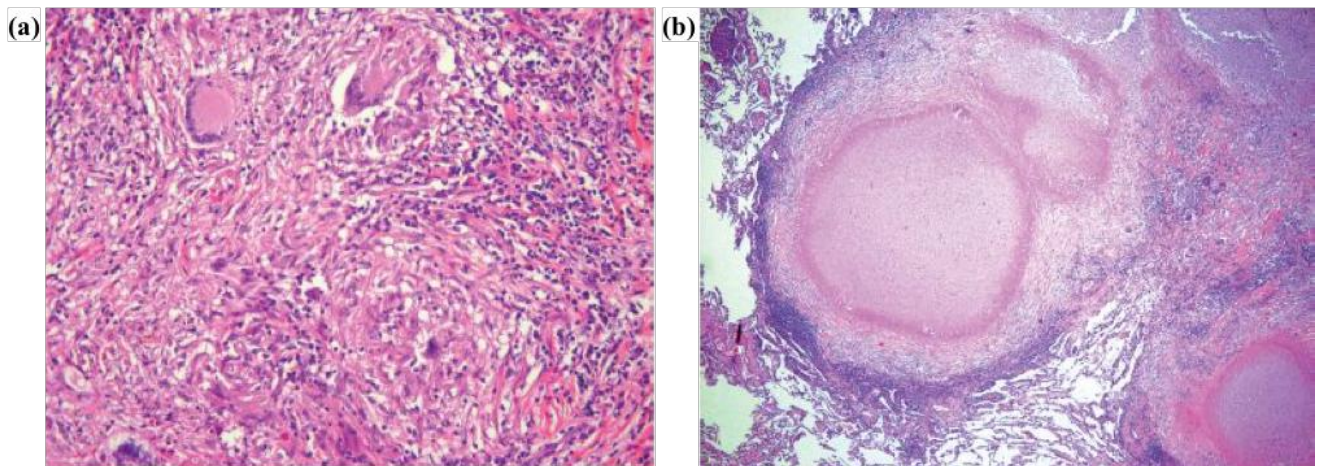


Figure 33 : Granulomes géant-épithélio-cellulaires

(a) Granulome épithélio-giganto-cellulaire sans nécrose d'étiologie tuberculeuse. **(b)**

Granulome épithélio-giganto-cellulaire avec nécrose centrale

(<http://granuloma.homestead.com/index.html>).

1.3.2. Granulomes à aspect palissadique des cellules épithélioïdes

Ils correspondent à un sous type de granulomes nécrosants, dans lesquels les phagocytes mononucléaires périphériques sont allongés et alignés et placés perpendiculairement au bord de la zone de nécrose centrale (**Figure 34**).

Les plus courants sont les nodules rhumatoïdes et les granulomes nécrobiotiques post-chirurgicaux. Ils ont aussi été rapportés dans la maladie de Churg et Strauss, les réactions granulomateuses à corps étranger, les lymphomes cutanés, la granulomatose de Wegener mais aussi dans certaines infections (mycobactéries non tuberculiniques, maladie des griffes du chat, syphilis, cryptococcose...).

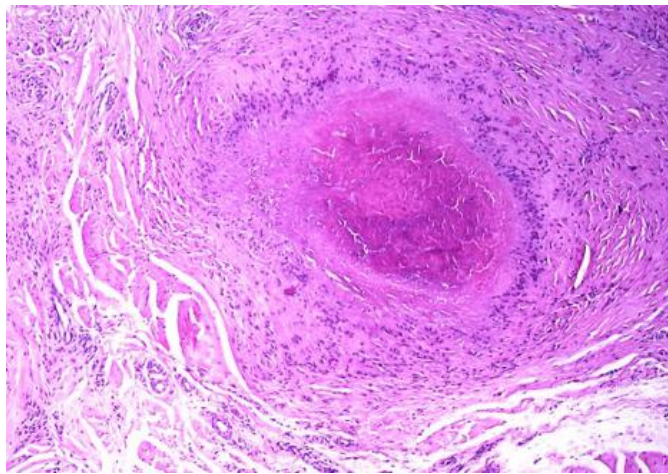


Figure 34 : Granulome palissadique

Les cellules épithélioïdes sont organisées en palissade autour de la zone de nécrose centrale (<http://granuloma.homestead.com/index.html>).

1.3.3. Granulomes pyo épithélioïdes ou suppurants

Les granulomes suppurants (avec abcès central ou formation de micro abcès) sont généralement trouvés au niveau des ganglions dans la maladie des griffes du chat (Bartonellose), les infections à *Chlamydia* et la tularémie (**Figure 35**).

Dans ces conditions, on observe des granulomes généralement larges et de formes irrégulières et parfois étoilées. La partie centrale est constituée d'une zone de nécrose purulente contenant de nombreux polynucléaires plus ou moins altérés. Celle-ci est entourée de cellules de type histiocytaire ou épithélioïde avec de rares cellules géantes. Ces granulomes suppurants peuvent aussi être retrouvés dans une grande variété de maladies infectieuses (*Yersinia*, actinomycose, infections fongiques) mais sont rares dans la sarcoïdose.

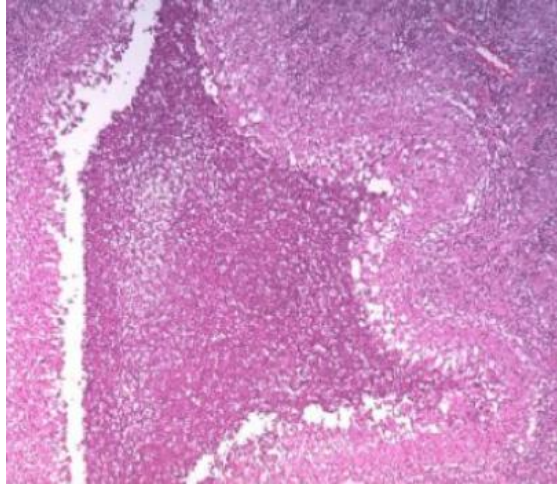


Figure 35 : Granulome pyo épythélioïde

Granulome suppurant avec abcès central d'étiologie inconnue (<http://granuloma.homestead.com/index.html>).

1.3.4. Granulomes avec anneau de fibrine

Aussi appelés en « beignet » (donut-like), ces granulomes sont petits, non nécrosants et avec une apparence très distincte et généralement trouvés dans le foie ou moelle osseuse chez les patients atteints de fièvre Q (coxiellose) (**figure 36**).

Ces granulomes contiennent typiquement une structure semblable à un anneau fait de matériel fibrinoïde et peuvent avoir ou non une vacuole lipidique centrale. Bien que peu commun, ils peuvent être observés dans diverses infections (CMV, EBV, hépatite A, mononucléose infectieuse, leishmaniose viscérale, maladie de Lyme, toxoplasmose).

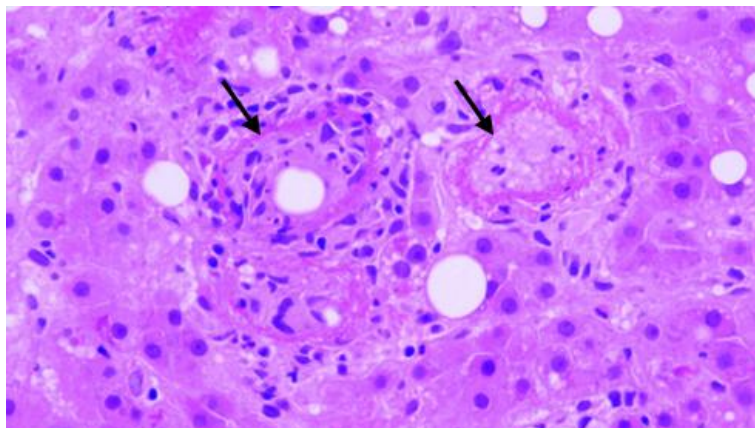


Figure 36 : Granulome avec anneau de fibrine

Les flèches noires indiquent les anneaux de fibrine (<http://granuloma.homestead.com/index.html>).

1.3.5. Granulomes à corps étranger

Dans les cas où le stimulus est non immun, la réaction granulomateuse est généralement diffuse et forme une zone inflammatoire composée d'histiocytes hypertrophiés, de lymphocytes et de cellules géantes de Müller et cela au sein d'un tissu conjonctif plus ou moins fibreux.

Généralement le corps étranger est visible. Il peut être exogène (grain de sable, de verre microscopiques, fil de suture...) (**Figure 37**) ou bien endogène dans le cas où une substance de l'organisme est considérée comme étrangère lors d'une anomalie (kératine, poil, cristaux de cholestérol...).

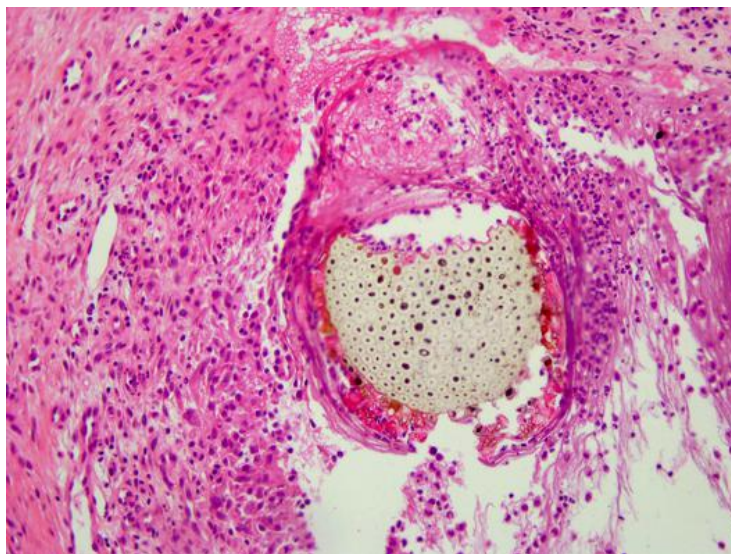


Figure 37 : Granulome à corps étranger

Réaction granulomateuse au contact d'une épine de rosier (<http://campus.cerimes.fr>).

1.4. Devenir du granulome

Les granulomes ne disparaissent jamais complètement. Leur évolution dépend de la cause de formation, du traitement et de la réponse immunitaire de l'hôte. Si le microorganisme ou le corps étranger à l'origine de la réaction granulomateuse est éliminé, il peut y avoir une résolution avec mise en place d'une fibrose cicatricielle. La fibrose est une cicatrisation pathologique au cours de laquelle il y a dépôt en excès de matrice extracellulaire. C'est une conséquence fréquente des processus inflammatoires et lors d'étiologies infectieuses (**Figure 38**).

Lorsque que granulome ne se résout pas, il peut y avoir des périodes de latence suivies d'une réactivation au cours de laquelle une pathologie infectieuse peut se disséminer. Dans ce

cas, il peut y avoir une nécrose du granulome accompagnée d'une calcification ou d'une liquéfaction.

Il faut également souligner le rôle dichotomique du granulome et ce, aussi bien dans les étiologies inflammatoires qu'infectieuses. En effet, bien que la mise en place d'une réaction granulomateuse par l'hôte ait pour but de circonscire l'action ou d'éliminer un pathogène par exemple, il arrive dans certaines conditions (réaction inflammatoire exacerbée, immunodéficience...) que celle soit délétère et non bénéfique pour l'hôte.

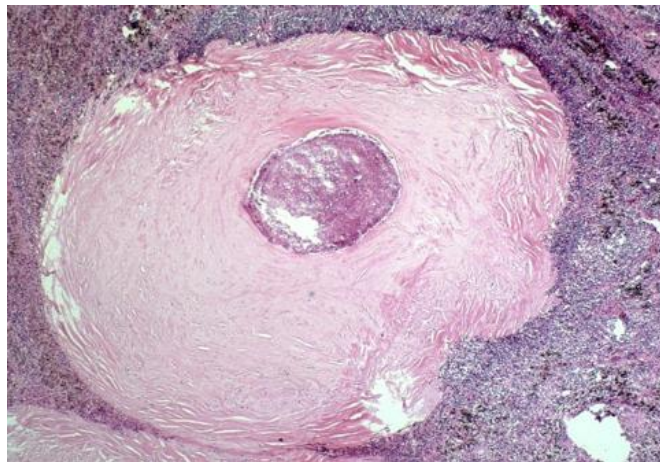


Figure 38 : Lésion fibrotique résiduelle

Granulome tuberculeux cicatrisé. On observe une fibrose et une calcification cicatricielles (<http://granuloma.homestead.com/index.html>).

2. Importance des granulomes en microbiologie et en mycologie médicales

Un certain nombre de pathologies infectieuses sont reconnues pour induire la formation de structures granulomateuses chez leur hôte. Pour certaines de ces infections, la formation de granulomes est caractéristique de leur physiopathologie.

2.1. Les granulomes bactériens

Certaines pathologies bactériennes telles que la syphilis (causée par *Treponema pallidum*) conduisent à la formation de réactions granulomateuses au niveau cutané.

Toutefois, la tuberculose reste la pathologie bactérienne la plus exemplaire de la formation de granulomes.

Mycobacterium tuberculosis

Il a été estimé qu'un tiers de la population mondiale est porteur sain de *Mycobacterium tuberculosis*, et qu'il en résulte 10 millions de nouveaux cas et 2 millions de morts par an (WHO 2016). *M. tuberculosis*, aussi appelé bacille de Koch, appartient au groupe des mycobactéries et a été découverte en 1882 par Robert Koch. Une des caractéristiques principales de l'infection par *M. tuberculosis* est la formation de structures multicellulaires appelées granulomes.

Ces structures granulomateuses aident au confinement des bacilles et permet de concentrer la réponse immunitaire au site de l'infection qui est ainsi contenue chez 90% des individus. Cependant, si la charge bactérienne est contrôlée au sein de ces structures, l'éradication des bacilles n'est pas totale. 10% des individus infectés vont subir une réactivation des bacilles et développer une tuberculose active. Le granulome semble donc jouer un rôle crucial dans le devenir de l'infection et cela permet la formation d'un large spectre de structures granulomateuses au sein d'un même hôte humain.

La composition cellulaire des lésions granulomateuses tuberculeuses inclut des macrophages infectés ou non-infectés issus de la circulation, des macrophages spumeux, des cellules épithélioïdes, des cellules multinucléées géantes (cellules de Langhans), des lymphocytes T et B et des fibroblastes (Ramakrishnan 2012) (**Figure 39a**).

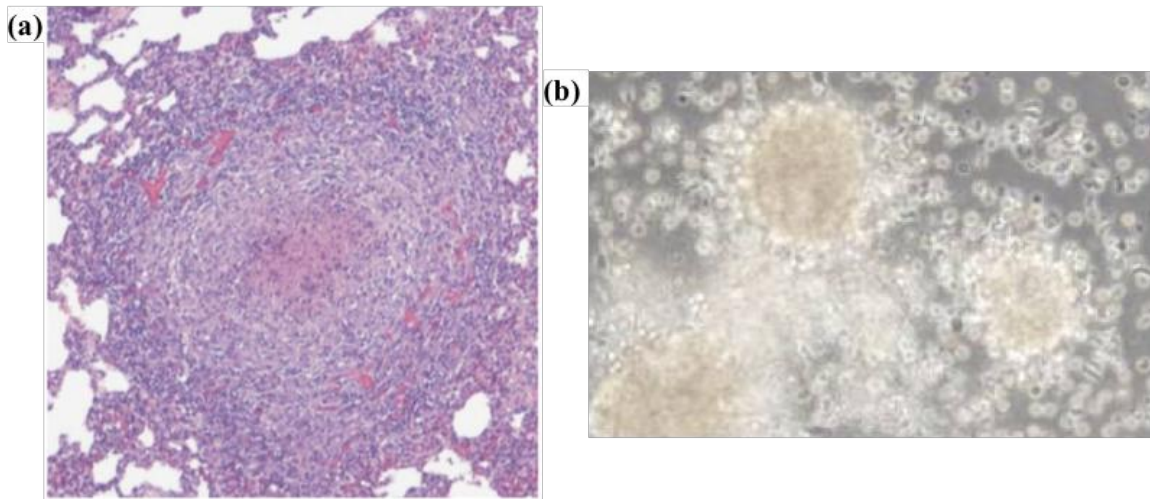


Figure 39 : Granulomes à *Mycobacterium tuberculosis*

(a) Granulome typique représentatif de la tuberculose avec une nécrose centrale (tissu pulmonaire de cochon, coloration éosine-hematoxiline) (Guirado et Schlesinger 2013). (b) Granulome à *M. tb in vitro* obtenu après infection de PBMCs 7 jours post-infection (Guirado *et al.* 2015).

Dans la tuberculose pulmonaire humaine, le processus de formation de granulome commence rapidement après l'infection. Une fois inhalée, *M. tuberculosis* est ingérée et transportée par les macrophages alvéolaires à travers l'épithélium alvéolaire au sein du tissu pulmonaire et des ganglions lymphatiques adjacents. Il y a ensuite dissémination *via* la circulation sanguine et lymphatique. Cela induit une cascade d'évènements aboutissant à la production de cytokines pro et anti-inflammatoires. La réponse immune générée stimule l'activation des propriétés antimicrobiennes des phagocytes et permet le recrutement de nouveaux leucocytes mononucléaires au site de l'infection. Cette accumulation de cellules autour de l'amas de cellules infectées conduit à la formation d'une masse cellulaire riche en macrophages appelée granulome (Guirado et Schlesinger 2013). *M. tuberculosis* peut persister pendant plusieurs décennies au sein des structures granulomateuses mais suite à une baisse des défenses immunitaire (VIH, diabète, cancer, facteurs génétiques...) la bactérie peut se réactiver. Une régulation fine des réponses immunes pro et anti-inflammatoires est essentielle pour le contrôle de la prolifération bactérienne au sein des granulomes et la résolution de ces lésions granulomateuses au cours du temps. Donc, un dérèglement des réponses immunes peut permettre la progression du granulome et de la maladie. De plus, une accumulation de la nécrose caséuse au centre du granulome permet le développement de tissu nécrotique et l'écroulement du centre du granulome qui relargue alors des bacilles virulents à d'autres niveaux du tissu où de nouvelles lésions seront alors formées. Au niveau des poumons, la

rupture des granulomes dans les voies respiratoires permet la transmission de la bactérie à d'autres individus.

En général, la production de cytokines est essentielle pour le recrutement des cellules inflammatoires au site de l'infection, notamment celles se fixant au récepteur CCR2 et qui jouent un rôle essentiel dans le recrutement précoce des macrophages (Algood *et al.* 2003). A ce stade, le TNF produit par les macrophages infectés et les cellules T joue un rôle crucial dans le maintien des structures granulomateuses en conservant des niveaux suffisants de cytokines, le recrutement et la rétention cellulaire (Chakravarty *et al.* 2008). L'accumulation de CPA infectées (macrophages et cellules dendritiques) au niveau des ganglions lymphatiques permet la mise en place d'une réponse immune adaptative contre *M. tuberculosis*. Une réponse immune de type Th1 est générée et les cellules T CD4+ sécrètent alors de l'IFN- γ et de l'IL-2. Les cellules T CD8+ semblent également jouer un rôle dans la réponse immune anti-*M. tuberculosis*. En effet, chez la souris les T CD8+ semblent importants au stade tardif de la formation granulomateuse par leur production d'IFN- γ et leur effet cytotoxique une fois la croissance du bacille stabilisée (Lazarevic et Flynn 2002).

Il a été proposé que les stades précoces de l'infection sont marqués par une polarisation M1 des macrophages, principalement due à la sécrétion d'IFN- γ . Cette polarisation M1 fournit aux macrophages leurs capacités mycobactéricides. Les stades tardifs sont caractérisés par un basculement vers une polarisation M2. De plus ce scénario semble contribuer à la formation des macrophages spumeux (expression du CD36) et des cellules géantes multinucléées (Lugo-Villarino *et al.* 2012).

L'IL-17 est le plus souvent associée à une réponse pro-inflammatoire et il a été suggéré qu'elle jouait un rôle au cours des stades précoces de la formation des granulomes en induisant le recrutement des neutrophiles et leur organisation autour du site de l'infection (Torrado et Cooper 2010). En effet, les macrophages et les neutrophiles coopèrent pour éliminer plus efficacement *M. tuberculosis* (Silva 2010). La principale source d'IL-17 au cours des infections à mycobactéries semble provenir des cellules T $\gamma\delta$ (Lockhart *et al.* 2006).

La description et la compréhension du rôle du granulome dans les infections à *M. tuberculosis* se sont faites par le biais du développement de modèles de granulomes à *Mycobacterium tuberculosis in vivo* et *in vitro*. Un modèle *in vivo* utilisant des macaques crabiers pour leur similitude avec l'Homme pour la pathologie de la tuberculose (forme active, latente et infection précoce) a permis, en étudiant de façon indépendante chaque granulome de chaque individu, de mettre en évidence et de comprendre les caractéristiques

fonctionnelles et dynamiques des cellules immunes et de *M. tuberculosis* de façon intra individuelle (Gideon *et al.* 2015). Une autre étude analysant les profils immunologiques de granulomes pulmonaires humains a permis de mettre en évidence que chaque granulome présente des caractéristiques qui lui sont propres (Subbian *et al.* 2015). Les modèles *in vitro* de granulomes permettent d'avoir une meilleure compréhension des interactions hôte-pathogène et des réactions immunes lors d'une infection à *M. tuberculosis*, mais aussi de définir la corrélation entre immunité et infection au sein de structures granulome-like (Bhavanam *et al.* 2016) (**Figure 39b**). Un modèle *in vitro* de granulome à *M. tuberculosis* humain, utilisant des PBMCs, a permis de mettre en évidence que la formation des granulomes, la survie de la bactérie, la prolifération des lymphocytes, la production de cytokines pro et anti-inflammatoires sont altérées chez les patients atteints de la forme latente de la maladie (Guirado *et al.* 2015). Ce modèle a également montré une signature transcriptionnelle spécifique de *M. tuberculosis* associée à sa survie au sein des granulomes, dépendante du statut immun de l'hôte.

2.2. Les granulomes parasitaires

Un certain nombre d'infections parasitaires induisent la formation de structures granulomateuses notamment lors de la présence du parasite (œuf, larve ou stade adulte) au sein de leur hôte humain.

2.2.1. *Schistosoma mansoni*

La schistosomiase aussi appelée bilharziose, est une maladie chronique très présente dans les régions endémiques provoquée par des trématodes (vers parasites) du genre *Schistosoma*. En 2013, le nombre de personnes traitées contre la schistosomiase était de 40 millions dans le monde (WHO 2015). Chez l'Homme, les principales espèces responsables sont *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* et *Schistosoma japonicum*.

Une des caractéristiques principales de l'infection à *S. mansoni* est la survenue d'une inflammation granulomateuse caractéristique qui se produit autour des œufs du parasite qui sont piégés au sein des tissus de l'hôte, notamment le foie et les intestins (**Figure 40**). Bien que dans la majorité des cas, les infections à *S. mansoni* sont relativement asymptomatiques ou montrent une morbidité restreinte associée à l'inflammation et à la fibrose intestinale, une minorité d'individus infectés développent une schistosomiase hépatosplénique sévère. Cette

forme hépatosplénique est caractérisée par une fibrose hépatique, une hépatosplénomégalie, une hypertension portale et peut causer la mort du patient en cas d'absence de soins médicaux adaptés (Hams *et al.* 2013).

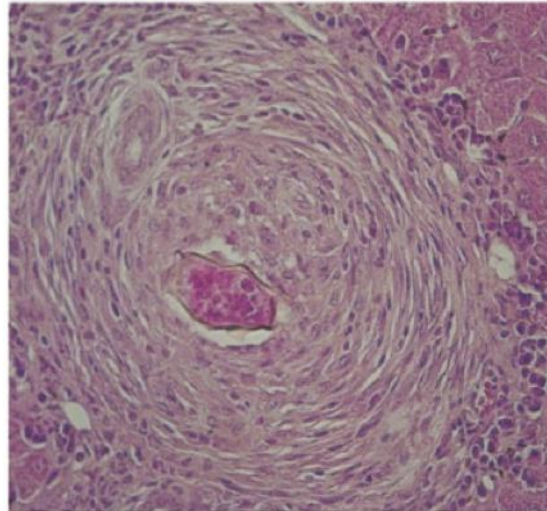


Figure 40 : Granulome à *S. mansoni*

Granulome hépatique avec un œuf de *S. mansoni* au centre (coloration hematoxiline-eosine, x200) (Herbert *et al.* 2004).

La pathogénèse de granulome à *S. mansoni* est relativement bien connue. L'infection par *S. mansoni* se fait suite à une exposition à de l'eau contaminée puis par la pénétration des cercaires par la peau. Les cercaires se transforment ensuite en schistosomules et migrent *via* les circulations vasculaires et lymphatiques vers les poumons jusqu'au système porte hépatique. Les schistosomules migrent vers le système veineux mésentérique, où les vers adultes peuvent vivre jusqu'à 5 à 10 ans. Une femelle schistosome produit environ 300 œufs par jours qui sont relargués dans la circulation mésentérique. Ces œufs sont viables, métaboliquement actifs et très antigéniques. De plus ils peuvent adhérer à l'endothélium des vaisseaux sanguins mésentériques, notamment au niveau des plaques de Peyer, où ils provoquent une inflammation granulomateuse qui favorise leur translocation vers la lumière intestinale et leur excrétion *via* les fèces (Turner *et al.* 2012). Les œufs qui passent à travers la barrière intestinale, sont excrétés et permettent alors la poursuite du cycle parasitaire. Cependant, certains œufs peuvent rester logés dans l'intestin, le foie ou d'autres sites de l'hôte où ils peuvent provoquer la bilharziose qui augmente la morbidité et la mortalité de l'hôte.

Les signes cliniques de la schistosomiase dépendent du stade de maturation des parasites et des œufs. Chez l'Homme, l'infection aiguë est caractérisée par une maladie

fébrile (fièvre de Katayama) qui survient généralement avant l'apparition des œufs dans les selles, avec un pic 6 à 8 semaines après l'infection. Dans la maladie chronique et en particulier dans la schistosomiase hépatosplénique, les œufs logés au sein des différents tissus provoquent la formation d'une réaction granulomateuse puis d'une fibrose du système porte hépatique qui provoque des lésions vasculaires obstructives, une hypertension portale et une hémorragie gastroœsophagienne.

L'importance des cytokines a été montrée dans la mise en place et le maintien des granulomes à *S. mansoni*. Suite à l'infection, l'hôte est exposé à des parasites immatures migrants. Il y a alors activation d'une réponse immune de type Th1 avec production d'IFN γ , de TNF- α et d'IL-12. Une réponse de type Th2 plus faible est également observée. Ensuite l'hôte est exposé à des parasites matures qui commencent à produire des œufs. Il y a une diminution de la réponse Th1 et une augmentation de la réponse de type Th2 (Pearce et MacDonald 2002) avec production d'IL-4, une augmentation de la production d'IgE et des éosinophiles circulants. Le pic de cette réponse de type Th2 correspond à la réponse cellulaire maximale contre les œufs et est associée à l'amplitude de la réponse granulomateuse autour de ces derniers.

La réponse granulomateuse autour des œufs de *S. mansoni* est également orchestrée par les cellules T CD4+. Les cellules T CD8+, les lymphocytes B et les macrophages M2 jouent également un rôle important dans la régulation de la formation des granulomes (Girgis *et al.* 2014; Herbert *et al.* 2004; Fallon *et al.* 1998). Les éosinophiles forment également une structure importante de ces granulomes bien que leur rôle exact ne soit pas encore connu (Moore *et al.* 1977). L'importance des T CD4+ dans la mise en place et la régulation des granulomes à *S. mansoni* a été montrée chez la souris (Fallon *et al.* 1998). En effet, chez des souris déficientes en cellules T CD4+, moins de granulomes ont été observés autour des œufs. Toutefois, la mortalité observée a été beaucoup plus importante. Cela illustre le paradoxe : les granulomes formés pour encapsuler les œufs induisent la pathologie mais ils ont également un rôle primordial dans la protection de l'hôte. En effet, la réponse inflammatoire remplit aussi une importante fonction protectrice pour l'hôte lors de l'infection (MacDonald *et al.* 2002). Le granulome, riche en cellules comme des cellules Th2, des éosinophiles et des macrophages M2 se forme pour protéger les tissus hôte des toxines produites par les œufs, non seulement en fournissant une barrière physique entre les tissus et l'œuf mais aussi en séquestrant les substances antigéniques sécrétées par les œufs. Cela est d'une importance vitale, notamment au niveau du foie en raison de l'hépatotoxicité associée aux antigènes des œufs. Cependant, une activation constante du système immunitaire au cours du temps, en particulier une

réponse de type Th2, aboutit à une « cicatrisation » excessive et mène invariablement au développement de lésions fibreuses à la place du granulome.

2.2.2. *Leishmania* spp.

Les leishmanioses sont des maladies parasitaires vectorielles provoquant des pathologies très invalidantes, voire mortelles si elles ne sont pas traitées. Elles sont dues à différents parasites du genre *Leishmania* transmis par la piqûre d'insectes communément appelés phlébotomes. Chaque année, le nombre de nouveau cas de leishmanioses dans le monde est estimé à environ 2 millions.

Les leishmanioses peuvent se présenter sous différentes formes cliniques : cutanée, viscérale ou cutanéomuqueuse. La forme cutanée, souvent bénigne, se caractérise par des lésions ulcérées ou ulcérocroûteuses qui guérissent généralement spontanément en formant des cicatrices. La leishmaniose, suivant l'espèce infectante, peut évoluer vers une forme diffuse ou cutanéomuqueuse. La forme viscérale est la plus grave, mortelle en l'absence de traitement, et se manifeste par de la fièvre, une anémie, une hépatosplénomégalie et un gonflement des ganglions lymphatiques. Une des caractéristiques principales de la leishmaniose viscérale est la formation de granulomes au niveau du foie et de la rate.

Les granulomes à *Leishmania* ont été décrits de façon précise dès les années 80 dans le cadre des formes cutanées et viscérales de la pathologie (Ridley et Ridley 1986). Ils définissent d'une part l'inflammation granulomateuse avec principalement une activation focale des macrophages avec ou sans cellules épithélioïdes, avec absence d'infiltrations de neutrophiles et la destruction du parasite ; et d'autre part les granulomes avec lyse des macrophages et monocytes, présence transitoire de neutrophiles et une nécrose centrale. Des études plus récentes ont décrit des cas de leishmaniose cutanée avec de très nombreux granulomes caséux (Aoun *et al.* 2014). De plus, la présence de granulomes présentant des cellules multinucléées géantes et des cellules épithélioïdes est associée à une bonne réponse et un besoin moindre en traitement pour éradiquer l'infection, alors que la présence de nécrose et d'infiltrats polymorphes est délétère pour la réponse anti-*leishmania* par les granulomes.

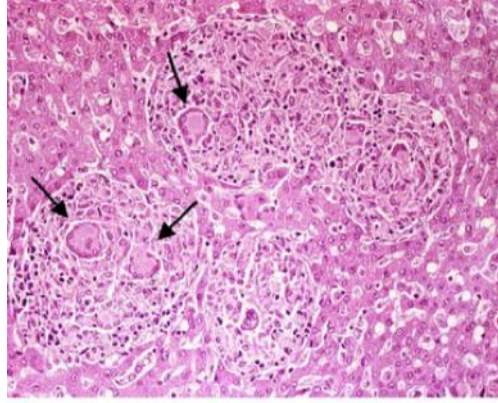


Figure 41 : Granulomes à *Leishmania*

(a) Cycle parasitaire de *Leishmania* (<https://www.cdc.gov>). (b) Coupe histologique montrant des granulomes hépatiques chez le singe rhésus 9 semaines après infection. On peut voir une accumulation de cellules épithélioïdes et de cellules de Langhans (flèches noires) entourées de lymphocytes (coloration hematoxiline-éosine) (Porrozzi *et al.* 2006).

Contrairement à la peau, la réponse cicatricielle est plutôt faible au niveau des granulomes systémiques. Cela a permis l'observation des fonctions antimicrobiennes de ces granulomes qui sont donc indépendantes du processus de cicatrisation. Les études détaillées des granulomes lors des leishmanioses viscérales chez l'Homme sont rares en raison des difficultés d'échantillonnage afin de réaliser des études histologiques. Chez l'Homme, l'histopathologie de la forme viscérale reflète le plus souvent ce que l'on peut considérer comme un échec de l'inflammation granulomateuse pouvant être associé à un remodelage des tissus lymphoïdes, une splénomégalie / lymphadénopathie et des niveaux élevés de cellules plasmatisées (Kaye *et al.* 2004). Des granulomes avec des anneaux de fibrine (donut-like) ont aussi été observés au niveau du foie (Moreno *et al.* 1988). Une étude rétrospective iranienne de biopsies hépatiques a aussi montré la formation de granulomes hépatiques chez des patients atteints de Leishmaniose viscérale (Geramizadeh *et al.* 2011). Il a également été rapporté la présence de granulomes épithélioïdes au niveau du foie de patients asymptomatiques (Pampiglione *et al.* 1974). Une autre étude réalisée au Soudan a également montré que les granulomes épithélioïdes, bien que communs lors de la forme cutanée, ne sont pas régulièrement présents au niveau de la rate et des ganglions lymphatiques chez les patients atteints de la forme viscérale active (Zijlstra et el-Hassan 2001).

Différents modèles *in vivo* sont utilisés pour étudier la granulogénèse au cours de la Leishmaniose ; notamment le singe rhésus où la cinétique de formation des granulomes hépatiques et cutanés a été étudiée (Porrozzi *et al.* 2006) (**Figure 41b**). Le chien chez qui les granulomes cutanés et hépatiques ont été largement caractérisés et où des similitudes avec

l'Homme et le singe ont été mises en évidence. En effet, chez des chiens asymptomatiques ayant une faible charge parasitaire des preuves histopathologiques d'une forte réponse granulomateuse dans le foie ont été mise en évidence avec notamment un recrutement des cellules T effectrices et une activation locale des macrophages et cellules dendritiques ; alors qu'un nombre moindre de granulomes moins bien organisés est observé chez des chiens symptomatiques présentant une forte charge parasitaire (Sanchez *et al.* 2004). Il est à noter que bien que la réponse immunitaire soit corrélée avec la charge parasitaire et le statut immun dans le foie, cela est moins évident au niveau de la rate, reflétant la dichotomie de la réponse en fonction de l'organe que l'on observe aussi chez les modèles murins. Ces derniers modèles *in vivo* chez la souris ont permis d'étudier plus en détail la formation des granulomes (Murray 2001). Chez la souris, alors que la réponse au niveau hépatique montre des caractéristiques communes avec ce qui observé lors de l'infection humaine ou canine et aussi au cours de l'infection résolue chez le primate, la rate ne parvient pas à mettre en place une réponse granulomateuse efficace et présente les caractéristiques de la progression de la maladie chez l'Homme, le chien et le primate. Cette expression d'une immunité organe-spécifique, au sein du même hôte, fournit un exemple clair de la compartimentation de la réponse immune basée sur des facteurs environnementaux spécifiques d'un tissu (Kaye *et al.* 2004; Engwerda et Kaye 2000).

2.3. Les granulomes fongiques

Les microorganismes fongiques sont également responsables de pathologies accompagnée de la formation de granulomes, comme par exemple *Histoplasma capsulatum* et *Cryptococcus neoformans*. Cela peut aussi être le cas lors de mycoses dites « exotiques » comme les coccidioïdomycoses et les blastomycoses.

2.3.1. *Histoplasma capsulatum*

Histoplasma capsulatum est un champignon ascomycète microscopique dimorphique. La forme filamenteuse est retrouvée dans l'environnement et en culture (27-30°C) et la forme levure, dans les tissus et en culture à 37°C (**Figure 42a et b**). La forme levure en fait un pathogène intracellulaire facultatif pour les macrophages des mammifères, et qui peut notamment résider dans le phagolysosome (Therby *et al.* 2004; Woods 2003). *H. capsulatum* est responsable d'infections respiratoires appelées histoplasmoses qui se produisent suite à

l'inhalation des spores. L'histoplasmose résulte souvent en une infection bénigne ou asymptomatique chez les individus immunocompétents. Chez le patient immunodéprimé, l'absence du fonctionnement normal du granulome permet au champignon de disséminer de façon systémique et peut entraîner une maladie sévère voire mortelle (Zerbe et Holland 2005). Ce champignon est surtout retrouvé aux Etats-Unis (ouest), mais aussi en Amérique du Sud et Centrale ainsi qu'en Asie, au Proche-Orient et en Afrique noire, tandis que les cas observés en Europe sont essentiellement d'importation (Therby *et al.* 2004).

L'infection des macrophages par *H. capsulatum* induit la formation de granulomes dans différents tissus hôtes (**Figure 42c**). Comme pour d'autres infections induisant la formation de granulomes, la mise en place d'une réponse granulomateuse normale est nécessaire pour contenir la croissance fongique, prévenir l'infection systémique et protéger les organes des dégâts causés par la propagation de l'inflammation. Les données cliniques et expérimentales indiquent que les cellules T, l'IFN- γ et le TNF- α sont primordiaux pour la protection de l'hôte contre les infections à *H. capsulatum*. (Clemons *et al.* 2000; Allendoerfer et Deepe 1998).

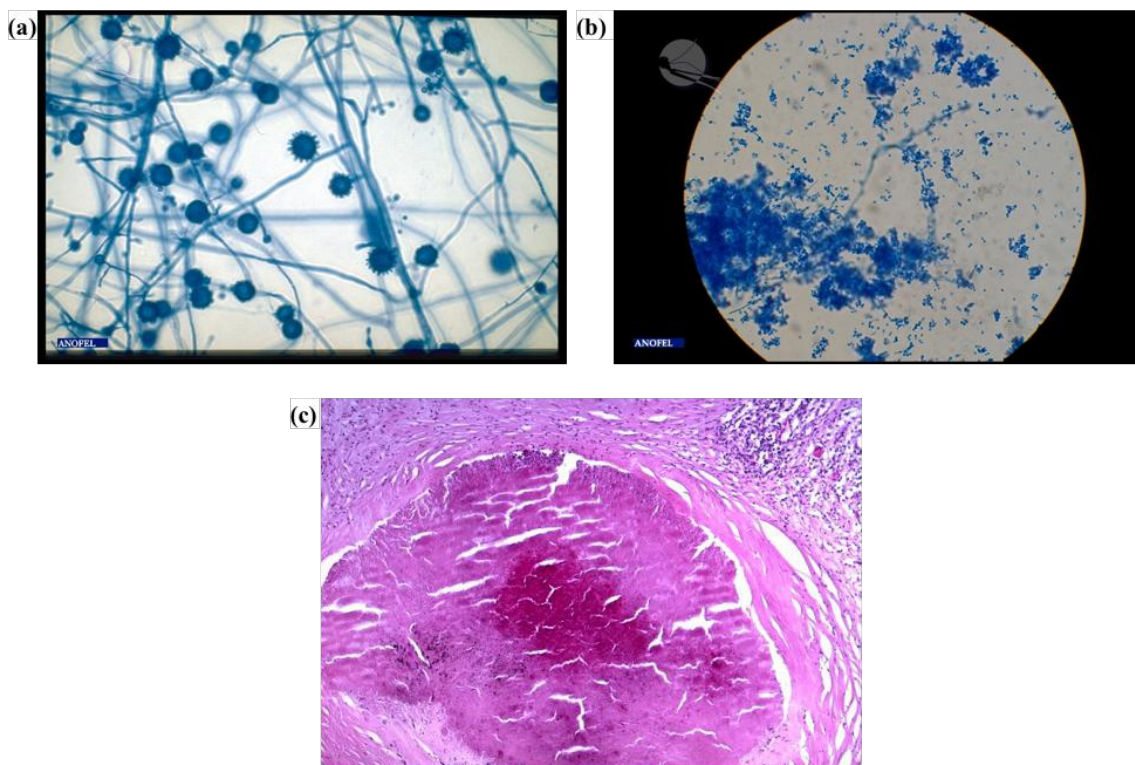


Figure 42: Granulome à *Histoplasma capsulatum*

(a) Aspect microscopique de la forme filamenteuse et (b) de la forme levure sur gélose au sang frais (<http://www.eanofel.fr>). (c) Granulome pulmonaire à *Histoplasma capsulatum* partiellement calcifié (stade tardif) (<http://granuloma.homestead.com/index.html>).

Bien qu'il y ait de plus en plus de connaissances sur la nature de la réponse de l'immunité systémique au cours de l'histoplasmosse (Thind *et al.* 2015; Deepe 2005; Lin et Wu-Hsieh 2004) peu de choses sont connues sur la réponse immune locale au sein du granulome malgré le fait que ces lésions représentent la principale interface entre l'agent fongique et l'hôte. Heninger *et al.*, en 2006, réalise une étude au cours de laquelle des granulomes induits par *H. capsulatum* sont pour la première fois isolés chez des souris infectées. Sept jours après infection, les granulomes sont déjà présents en quantité importante dans le foie sont composés de macrophages et de lymphocytes, notamment des T CD4+ et T CD8+ avec au centre des cellules épithélioïdes et des levures de *H. capsulatum* sans nécrose. Leur taille diminue des 10 jours post infection, ce qui reflète la cinétique de la clairance de *H. capsulatum*. Au sein des structures granulomateuses, il y a une forte production d'IFN- γ par les lymphocytes T CD4+ et CD8+ et de TNF- α par les macrophages. Il en ressort également une forte activité cytokinique Th1.

2.3.2. *Cryptococcus neoformans*

Parmi les cryptocoques, *Cryptococcus neoformans* est l'espèce la plus fréquemment retrouvées en pathologie humaine et notamment les deux variétés *C. neoformans* var. *neoformans* et *C. neoformans* var. *gattii*. *C. neoformans* qui sont cosmopolites. *C. gattii* est aussi un saprophyte présent au niveau des zones tropicales et sub-tropicales. Ce sont des levures encapsulées (capsule polysaccharidique) (**Figure 43a**).

Les infections à cryptocoques sont appelées cryptococcoses. La contamination de l'Homme se fait par inhalation de poussières infectantes contenant des spores. Elles surviennent généralement chez des personnes immunodéprimées, notamment en cas de déficit de l'immunité à médiation cellulaire comme chez les patients atteints du VIH mais aussi chez des transplantés et des personnes sous corticothérapie. *C. gattii* peut également provoquer des cryptococcoses chez des personnes immunocompétentes.

C. neoformans présente un tropisme pour le système nerveux central et peut se disséminer par la circulation sanguine dans tout l'organisme notamment chez les patients très immunodéprimés. Les cryptococcoses peuvent se présenter sous formes cutanées (généralement suite à une dissémination hématogène) ou profondes. Les formes profondes les plus fréquentes sont les cryptococcoses neuroméningées et pulmonaires mais aussi au niveau osseux et oculaire. Bien que rare, la formation de granulomes peut être observée lors de cryptococcoses (Alzahrani *et al.* 2016; Xiujiao et Ai'e 2005; Torda *et al.* 2001; Hong *et al.*

2000). Le granulome typique à *Cryptococcus* ou cryptococome, est décrit comme un agrégat compact de macrophages, de cellules épithélioïdes et de cellules multinucléées géantes, ainsi que de cellules de Langhans, contenant de nombreuses cryptocoques intra-cytoplasmiques (Shibuya *et al.* 2005) (**Figure 43b**).

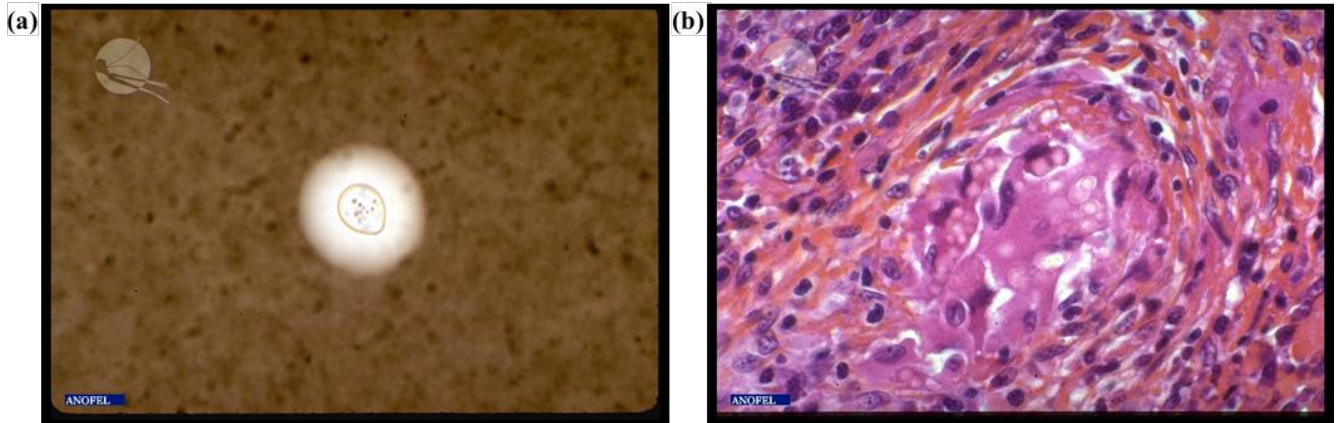


Figure 43 : Granulome à *Cryptococcus neoformans*

(a) Aspect microscopique d'une levure encapsulée de *C. neoformans* (encre de Chine, x1000).

(b) Réaction granulomateuse chez un sujet immunocompétent. On observe des cellules géantes contenant des levures rondes à capsule épaisse et réfringente (<http://www.eanofel.fr>).

Afin de mieux comprendre la progression de la maladie chez l'Homme, un modèle murin de formation de granulomes au niveau pulmonaire a été mis au point en utilisant une souche mutante de *C. neoformans* : *C. neoformans* Δ *gcs1* qui est incapable de synthétiser le sphingolipide glucosylcéramide (Farnoud *et al.* 2015). Cette délétion permet la formation de granulomes pulmonaires chez les souris immunocompétentes alors que l'infection de souris immunodéprimées résulte en une dissémination fongique et en la mort de l'hôte. Ce phénomène mime la physiopathologie de *C. neoformans* chez l'Homme.

En ce qui concerne la formation des granulomes, il semble que l'immunité Th1 joue un rôle important (Kobayashi *et al.* 2001b), tout comme l'IL-12 et l'IFN- γ dans la protection et la défense de l'hôte face à *C. neoformans* (Decken *et al.* 1998; Hoag *et al.* 1997).

3. Les granulomes à *Candida*

Dans le contexte des infections fongiques chroniques et invasives, le processus inflammatoire multicellulaire est particulièrement important pour la clairance fongique, la

protection des tissus sains environnants et la prévention de la dissémination fongique. En effet, lors de l'interaction entre les cellules immunitaires de l'hôte et *Candida*, il y a mise en place d'un recrutement multicellulaire au niveau du site de l'infection dans le but d'initier une réponse inflammatoire et d'éradiquer le pathogène.

Toutefois, il arrive que lorsque *Candida* ne parvient pas à être éliminé, un processus inflammatoire se met en place. Une réaction d'hypersensibilité retardée est alors initiée autour de l'agent fongique. Celle-ci est généralement composée de cellules immunes organisées et d'une matrice extracellulaire. Ces structures, appelées granulomes mais aussi réactions granulomateuses, sont des infiltrats immuns tardifs composés de macrophages sanguins infectés ou non, de neutrophiles, de cellules épithélioïdes et multinuclées géantes généralement entourées par un anneau de lymphocytes T et B (von Eiff *et al.* 1990).

Les granulomes sont des manifestations cliniques rarement étudiées et donc observées lors des candidoses. Toutefois, la mise en place de réactions granulomateuses excessives et / ou chroniques peut être délétère et former un réservoir au sein duquel *Candida* peut survivre et ré-émerger pour réactiver l'infection. Cela peut être le cas lors des candidoses cutanéomuqueuses chroniques (CMC) et des candidoses hépato-spléniques (CDC).

En effet, de rares cas de granulomes fongiques à *Candida* ont été rapportés au cours de CMC (Miri *et al.* 2012; Kauffman *et al.* 1981). Dans ces deux cas, les granulomes sont situés au niveau cérébral. Bien que les infections profondes soient rarement rapportées dans les cas de CMC, il semble probable que la formation des structures granulomateuses dans ces cas soient dues à une dissémination sanguine de *Candida*. Pour le cas rapporté par Miri *et al.*, l'IRM cérébrale a révélé chez la patiente une lésion frontale droite d'abord diagnostiquée comme une tumeur. Suite à l'opération, les examens pathologiques confirment une lésion granulomateuse à *C. albicans* (**Figure 44**).

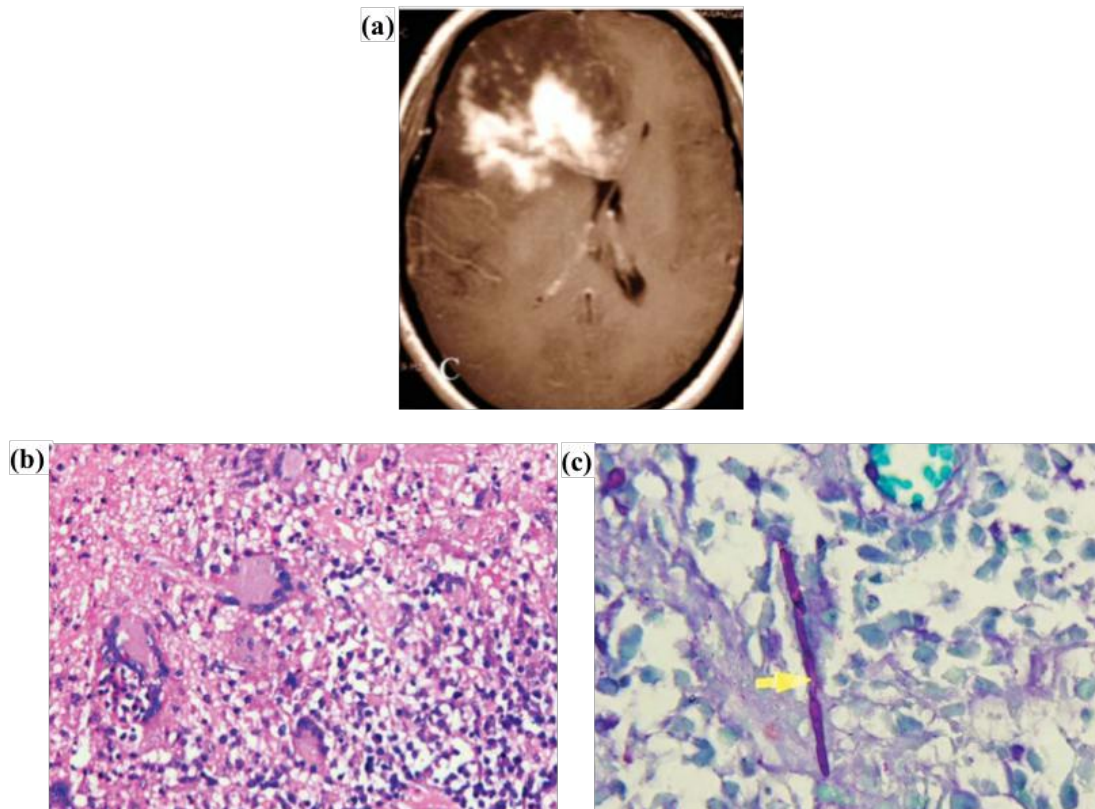


Figure 44 : Diagnostic et histologie du granulome à *Candida* dans le cadre de la CMC.

(a) IRM cérébral montrant une lésion frontale massive et hétérogène chez une patiente atteinte de CMC. (b) Coupe histologique de la lésion révélant une réaction granulomateuse (coloration hématoxyline-éosine, x40). (c) On observe la présence de pseudohyphes de *C. albicans* (flèche) au sein de la réaction granulomateuse (coloration à l'acide périodique, x100) (Miri *et al.* 2012).

Lors de candidoses disséminées chroniques (CDC) ou candidoses hépato-spléniques, la présence de lésions multiples hypodenses au niveau du foie et de la rate des patients est souvent observée. Cette pathologie rare est difficile à évoquer malgré l'apport de la détection d'antigènes comme le β -glucan. Des lésions peuvent être observées *via* l'imagerie médicale (IRM, scanner, échographie). Il s'agit de nodules, de micro-abcès ou de granulomes (Albano *et al.* 2016; Rammaert *et al.* 2012; Halkic et Ksontini 2007). Toutefois, le diagnostic final de candidose hépato-splénique peut-être établi seulement après biopsie afin de révéler la présence de multiples lésions granulomateuses (Albano *et al.* 2016) (**Figure 45**). Cette pathologie est associée à trois profils histologiques hépatiques différents : le granulome, la nécrose avec une réaction inflammatoire minimale et/ou le micro-abcès avec une réaction inflammatoire. La nécrose et les micro-abcès sont également observés au cours des

candidoses invasives. Lorsqu'il y a nécrose, celle-ci a souvent un aspect hémorragique et est principalement observées chez les patients neutropéniques alors que les micro-abcès sont généralement vus après le retour des PNNs. Les lésions granulomateuses, elles, sont caractérisées par la présence de levures et d'hyphes ou d'une nécrose centrale, entourée de cellules multinucléées géantes, d'histiocytes épithélioïdes et/ou de fibroblastes organisés en palissade ainsi que d'une réaction inflammatoire intense (Kontoyiannis *et al.* 2000; von Eiff *et al.* 1990). Ces différents présentations histologiques peuvent être présents de façon concomitante au sein d'un même organe.

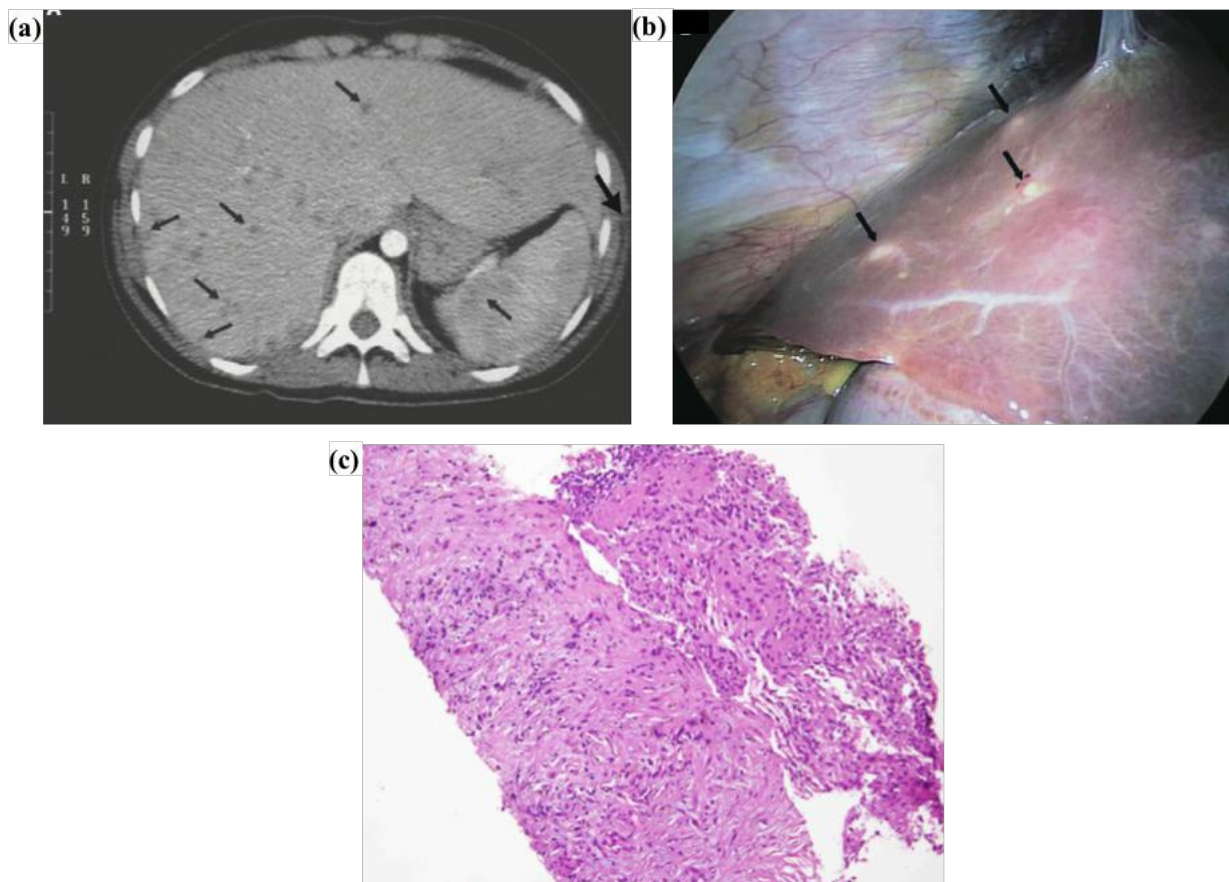


Figure 45 : Diagnostic et histologie du granulome à *Candida* dans le cadre de la candidose hépatosplénique

(a) Scanner abdominal montrant de multiples lésions denses au niveau du foie et de la rate (flèches noires et (b) photographie de laparoscopie, *C. albicans* a été identifié dans les lésions granulomateuses (flèches noires) (Halkic et Ksontini 2007). (c) Coupe histologique d'une biopsie hépatique montrant des granulomes ainsi que des infiltrats inflammatoires (coloration hématoxyline-éosine) (Albano *et al.* 2016).

Cette pathologie peut également provoquer des lésions au niveau d'autres organes que le foie et la rate, comme les poumons et les reins (De Castro *et al.* 2012; Karthaus *et al.* 2006). Des cas de néphrites granulomateuses à *Candida* ont été rapportées au cours desquelles il a été observé la présence de granulomes à *Candida* dans les organes infectés (Ogura *et al.* 2012; Song *et al.* 2012) (**Figure 46**). Des granulomes laryngiens à *Candida* ont également été rapportés au niveau du cartilage des cordes vocales (Yumoto *et al.* 2008).

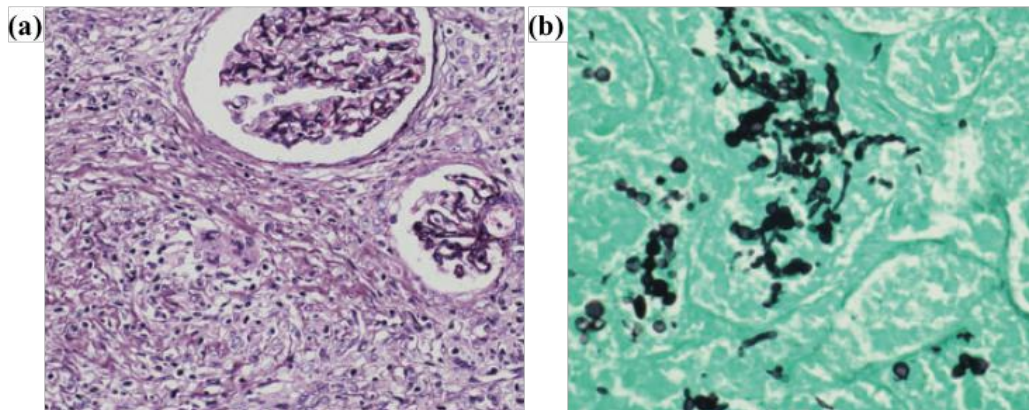


Figure 46 : Histologie d'un granulome rénal à *C. albicans*

(a) Coupe histologique des lésions granulomateuses retrouvée au niveau rénal (coloration à l'acide périodique et au méthénamine d'argent de Grocott, x200). (b) Une coloration à l'acide périodique révèle la présence de levures et de pseudohyphes de *C. albicans* (x400) (Ogura *et al.* 2012).

Les infections du SNC par *Candida*, en dehors de la méningite, peuvent également aboutir à la formation de micro-abcès et de granulomes. Cette localisation est plus fréquente dans le cadre de candidoses disséminées et dans un contexte d'immunosuppression (Pahud *et al.* 2009; Dubey *et al.* 2005; Burgert *et al.* 1995) que chez des patients immunocompétents et sans manifestation systémique (Hoarau *et al.* 2013; Borha *et al.* 2009; Akyuz *et al.* 2002; Ikeda *et al.* 1990). L'imagerie médicale (IRM et scanner) ne permet parfois pas de poser un juste diagnostic en raison des lésions aspécifiques qui peuvent être confondues avec des tumeurs (Hoarau *et al.* 2013; Akyuz *et al.* 2002) (**Figure 47a et b**). Les rares études histopathologiques montrent que les micro abcès forment habituellement des foyers de nécrose entourés des leucocytes et de PNNs (Pahud *et al.* 2009) alors que les granulomes sont non-nécrotiques, entourés de cellules géantes et peuvent renfermer des levures ou des hyphes (Hoarau *et al.* 2013) (**Figure 47c et d**).

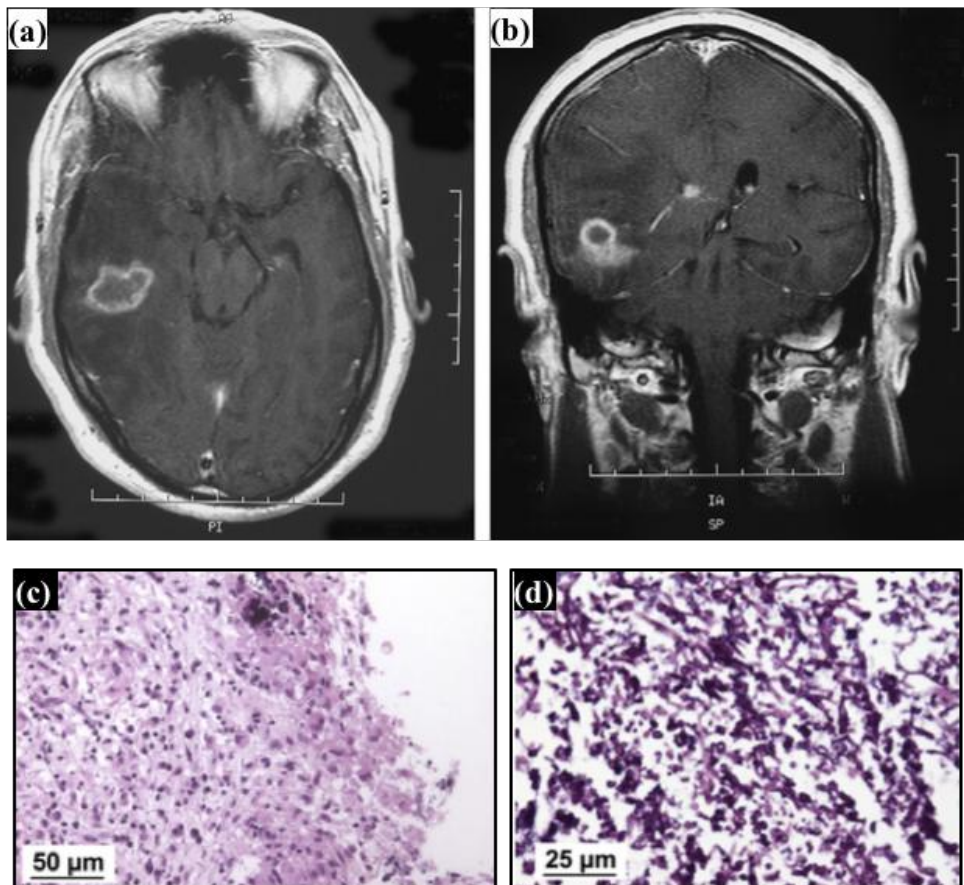


Figure 47 : Diagnostic et histologie des granulomes cérébraux à *Candida*

IRM cérébral (a) coupe axiale et (b) coupe coronale montrant une lésion temporale droite hétérogène (Bohra *et al.* 2009). Histopathologie d'un granulome cérébral. (c) Granulome avec présence de cellules géantes multinucléées (coloration hematoxyline-éosine, x200). (d) Coloration à l'acide périodique montrant des levures et des pseudohyphes (x400) (Hoarau *et al.* 2013).

Peu de choses sont connues sur la réponse immunitaire générale et locale au sein du granulome à *Candida*. Le rôle de cette interaction hôte-pathogène particulière dans la physiopathologie des infections à *Candida* est peu étudié. Une meilleure compréhension des bases moléculaires de l'invasion fongique au sein du granulome ainsi qu'une meilleure connaissance de la réponse granulomateuse sont nécessaires afin de développer des stratégies de diagnostic et de thérapie efficaces contre ces infections fongiques. Pour ce qui est de la candidose hépato-splénique, il semble que la translocation digestive de *Candida* vers la circulation sanguine soit la principale voie de dissémination (Rammaert *et al.* 2012; Girmenia *et al.* 2004). Un modèle murin de colonisation gastro-intestinale de *Candida* a permis de mettre en évidence que le foie est le principal organe touché après une rupture de la barrière gastro-intestinale (Koh *et al.* 2008). Le fait que le granulome soit une des caractéristiques de

l'histopathologie de la candidose hépatosplénique suggère un rôle central de la réponse inflammatoire de l'hôte. Les études sur la réponse immune de l'hôte au cours de la CDC ont été menées sur la pathologie générale et non sur la formation du granulome. Toutefois, en se basant sur l'immunité adaptative, une réponse Th1 semble associée à une résistance à la candidose hépato-splénique alors que l'augmentation de la susceptibilité de l'hôte semble être associée à une réponse Th2 (Romani 1999). Dont le contrôle de la candidose passe par l'activation de la réponse innée qui déclenche à son tour l'activation de la réponse adaptative Th1 et la production de cytokines comme l'IFN-gamma et le TNF-alpha. L'étude des modifications de la « balance » cytokinique au cours de la CDC a mis en évidence qu'une réponse Th2 exacerbée, *via* l'augmentation de la production d'IL-10 et par la mise en place d'un environnement anti-inflammatoire, permet la survie de *Candida* spp. (Roilides *et al.* 1998).

4. Les modèles d'étude de l'interaction hôte-*Candida*

La description précise ainsi qu'une meilleure compréhension des interactions complexes entre l'hôte et *Candida* au sein du granulome ou des différents sites d'infection semblent nécessaires et passent par la mise au point de modèles d'études. Différents modèles existent pour étudier *Candida* et son interaction avec son hôte, allant du plus simple (billes de latex ou polystyrène ou co-culture simple) au plus complexe (modèle animal). Les véritables modèles de granulomes sont toutefois rares.

Billes recouvertes d'antigènes

L'adhérence de *Candida* aux cellules hôtes est un facteur de pathogénicité primordial notamment au cours de l'initiation de l'infection, tout comme l'endocytose de *Candida* peut l'être pour l'élimination de ce dernier par les cellules hôtes. Différentes études utilisant des billes de polystyrène ou de latex recouverte d'antigène de *Candida* (mannane, Als3...) mises en culture avec des lignées cellulaires ont permis d'étudier et de comprendre certaines interactions protéine-protéine permettant d'adhérence de *Candida* (Miyachi *et al.* 2007) et son endocytose (Moreno-Ruiz *et al.* 2009; Phan *et al.* 2007). Ce type de modèle a tout de même des limites en raison parfois de la difficulté à obtenir les protéines recombinantes mais

aussi du fait qu'il n'est possible que d'étudier un type d'interaction à la fois, ce qui ne reflète pas la complexité des interactions entre les cellules de *Candida* et les cellules de l'hôte lors de l'initiation de l'infection par exemple.

Co-cultures simples *Candida* / cellules

Les interactions entre les différentes cellules immunes ou épithéliales et *Candida* sont très étudiées. Pour ce faire, différents modèles de co-culture ont été mis en place, notamment entre des lignées cellulaires murines (RAW 264.7) ou humaines (Hela, HL-60) et *C. albicans* (Moreno-Ruiz *et al.* 2009; Spellberg *et al.* 2005; Marcil *et al.* 2002) mais aussi entre des cellules primaires (macrophages et cellules dendritiques) et des levures « heat-killed » de *C. albicans* (Newman et Holly 2001). Ces différentes études ont permis d'observer les capacités de phagocytose et de destruction de *Candida* par les différents types cellulaires étudiés. Toutefois, ces co-cultures simples, tout comme l'utilisation de *Candida* « heat-killed » parfois à des MOI (Multiplicity of Infection) élevées, ne reflète pas l'interaction multiple entre *Candida* et les différents types de cellules immunes au cours d'une infection.

Co-cultures multiples

Des modèles mettant en co-culture des PBMCs purifiés à partir de sang de donneurs et des levures de *Candida* ont également été mis au point. Une étude utilisant des levures « heat-killed » de *C. albicans* immobilisées sur des plaques de culture cellulaire auxquelles sont rajoutées des PBMCs humains a été mis au point afin d'étudier la formation de granulomes (Heinemann *et al.* 1997). Bien qu'une accumulation de cellules multinucléées géantes et de cellules épithélioïdes ait été observée, ces structures ne sont pas assez organisées et semblables aux granulomes observés chez des patients pour étudier la physiopathologie de la formation du granulome à *Candida*. D'autres études mettant en co-culture des PBMCs humains et des levures ou des hyphes de *C. albicans* « heat-killed » (van der Graaf *et al.* 2005), mais aussi des PBMCs avec des levures « heat-killed » de *C. albicans* ou de *C. parapsilosis* (Toth *et al.* 2013) ont pour but d'étudier la production de cytokines en fonction du stade morphologique de *C. albicans* mais aussi entre différentes espèces. Bien que ces modèles soient plus complexes, l'interaction véritable de *Candida* avec les cellules immunes ne peut être étudié de façon précise en utilisant des levures « heat-killed » et des inocula élevés.

Zebra-Fish / *Candida*

Des modèles plus complexes comme les embryons de Zebra-fish (*Danio* sp.) ont également été utilisés pour étudier les interactions inter-espèces au cours d'une infection à *C. albicans* (Kuo *et al.* 2013; Wang *et al.* 2013). Des embryons mutants déficients en pour la myéloperoxydase (MPO) ont également permis d'évaluer l'importance des neutrophiles dans la réponse inflammatoire aux infections fongiques (Wang *et al.* 2015). Bien que les avantages de l'utilisation des Zebra-fish pour l'étude de l'organogénèse soient clairs, pour ce qui est de l'étude des interactions hôte-pathogène, cela semble plus controversé (Bernut *et al.* 2015). En effet, l'immunité adaptative ne se met en place qu'un mois après la fécondation, au stade jeune adulte, ce qui ne permet pas d'étudier la réponse immunitaire dans son ensemble. De plus, la température de maintien des embryons, comprise entre 26 et 29°C, n'est parfois pas compatible avec l'activité du pathogène dont les facteurs de virulence sont adaptés à la température de leur hôte humain, c'est à dire 37°C. Des limitations techniques sont également présentes comme l'absence d'anticorps monoclonaux contre les marqueurs de surface des cellules de l'embryon ou bien de test ELISA pour le dosage des cytokines.

Embryons de poulet / *Candida*

Un autre modèle utilisant cette fois des embryons de poulets infectés par des levures « heat-killed » de *C. albicans* et *C. glabrata* via la membrane chorio-allantoïde a été mis au point pour étudier la pathogénèse des infections à *Candida* ainsi que le rôle du système immunitaire dans cet hôte alternatif (Jacobsen *et al.* 2011). La réponse caractéristique de l'embryon face à cette infection est la formation de granulomes. Toutefois, le développement du système immunitaire de l'embryon qui évolue, influence grandement sur sa susceptibilité à l'infection. De plus, l'embryon de poulet est naturellement considéré comme un hôte immunodéprimé et ne correspond pas entièrement à la réponse que l'on peut trouver chez les mammifères, mais de par sa facilité et son faible coût de mise en œuvre, pourrait être utilisé afin de formuler des hypothèses sur la pathogénèse de *Candida*.

Modèles murins

Un des modèles les plus utilisés pour l'étude de *Candida* reste le modèle murin. Du fait de la large galerie de pathologies associées à *Candida*, un grand nombre de modèles murins différents existent : des modèles de candidose orale, vaginale ou bien cutanée mais aussi des modèles de candidoses systémiques (Conti *et al.* 2014). Pour l'étude des candidoses systémiques et notamment du comportement du pathogène et du déroulement (initiation et

progression) de la pathologie, deux principaux modèles murins existent (Szabo et MacCallum 2011). Dans le modèle d'infection intraveineuse, les cellules fongiques sont injectées et se disséminent rapidement *via* la circulation, avec mise en place d'une forte réponse anti-inflammatoire. Ce type de modèle peut aussi être utilisé avec des souris immunodéprimées. Le modèle de colonisation gastro-intestinale nécessite une introduction de *Candida* dans le tractus intestinal des souris (ingestion la plus souvent) et une thérapie anti-microbienne pour permettre la colonisation par *Candida* (Koh 2013). Il est particulièrement utilisé pour étudier les facteurs de virulence et les mécanismes immunitaires nécessaires à la translocation et la dissémination de *Candida* à partir du tractus intestinal. Malgré les nombreux apports de l'utilisation du modèle murin dans la compréhension de la virulence de *Candida* mais aussi du déroulement de l'infection, il faut garder à l'esprit la présence d'un certain nombre de différences entre la souris et l'Homme. Tout d'abord, contrairement à l'Homme, *Candida* n'est pas un commensal naturel de la souris et des différences immunes existent aussi entre l'Homme et la souris (distribution et fonctions des cellules immunes différentes) (Duggan *et al.* 2015b; Ermert *et al.* 2013). De plus, chez la souris l'organe le plus souvent touché au cours d'une candidose disséminée est le rein, alors que chez l'Homme l'affection du rein reste rare et concerne simultanément d'autres organes. C'est pourquoi il faut rester prudent dans les extrapolations des résultats obtenus des modèles murins aux situations rencontrées chez l'Homme.

En dépit des nombreux modèles d'étude existants, aucun ne permet l'étude du granulome à *Candida*. En effet, avec les différents modèles existant, il est impossible d'étudier en détail la granulogénèse mais aussi de définir les interactions cellulaires et moléculaires mises en place au sein de cette structure. C'est dans ce contexte que le laboratoire de Parasitologie et Mycologie Médicale IICiMed (EA 1155) a mis au point le premier modèle *in vitro* humain de granulome fongique à *C. albicans* (Alvarez-Rueda *et al.* 2012). Cette étude décrit la cinétique de formation du granulome suite à l'infection de cellules immunitaires humaines du sang périphérique (PBMCs et PNNs) issues de sujets sains par *C. albicans* (**Figure 48**). En effet, l'utilisation d'un modèle de granulogénèse fongique pour l'étude de ces interactions complexes entre l'hôte et le pathogène, constitue un outil, qui dans un contexte « human-like », permet l'étude des étapes physiopathologiques de la candidose, et ce pour différentes espèces de *Candida*. D'autre part il devrait permettre de comprendre le rôle du granulome dans la persistance de l'infection chez certains patients.

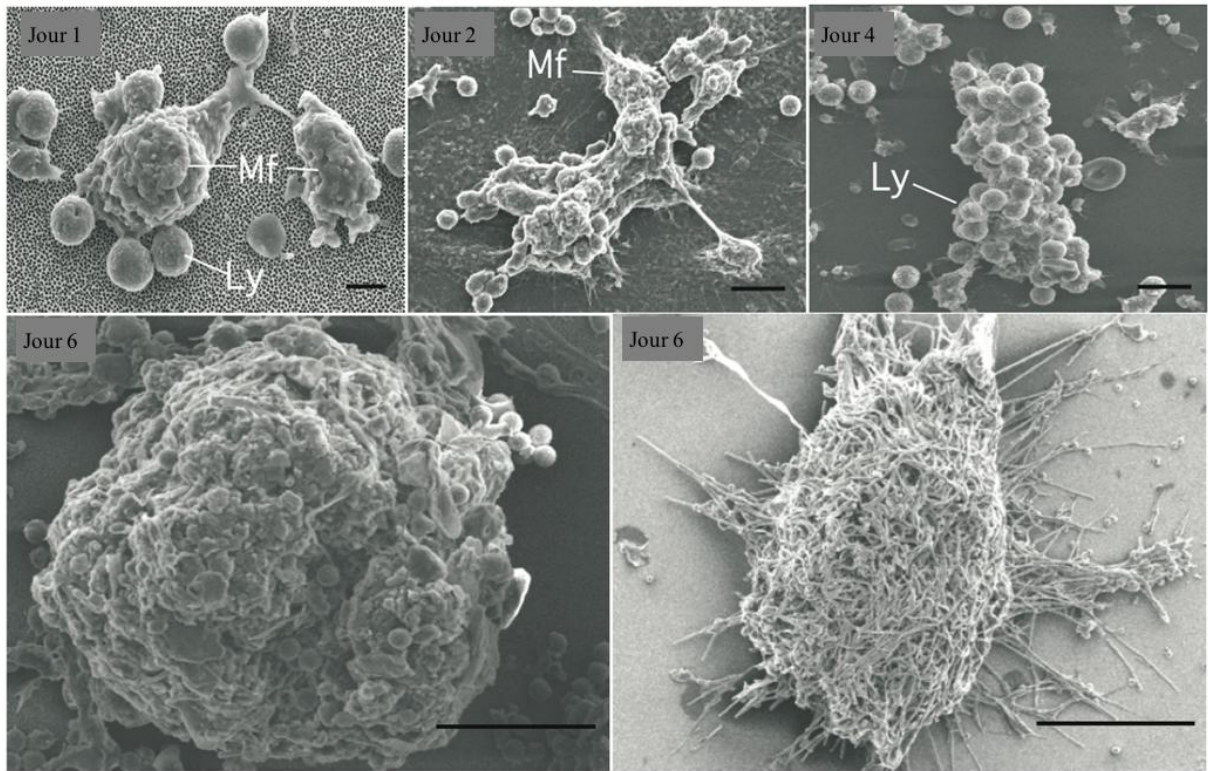


Figure 48 : Cinétique de formation du modèle de granulome à *C. albicans in vitro* par microscopie électronique à balayage

Mf = macrophages activés ; Ly = Lymphocytes. Les barres représentent 5 µm (jour 1), 10 µm (jours 2 et 4) et 50 µm (jour 6). (Alvarez-Rueda *et al.* 2012).

Partie II

Résultats expérimentaux

Article n°1

L'interaction cellulaire entre *Candida* et son hôte humain permet le contrôle ou la persistance de l'infection lors de la formation du granulome

Lors d'une infection à *Candida*, la réponse adaptée vis à vis du pathogène requière l'action coordonnée des neutrophiles et des macrophages mais également d'autres types cellulaires comme les cellules NK, les cellules dendritiques et les lymphocytes B et T (CD4 et CD8). Dans le contexte particulier des candidoses chroniques, un processus multicellulaire inflammatoire pourrait jouer un rôle crucial au niveau local dans le contrôle de l'infection et ce, en épargnant les tissus environnants. Cette réaction appelée granulome, composée de cellules immunes organisées autour du pathogène, initie la réponse inflammatoire permettant d'éviter la dissémination fongique. Cette étude a pour but d'observer au niveau cellulaire *in vitro*, la dynamique de l'interaction entre *Candida* et les cellules immunes lors d'une longue période et au sein notamment du granulome.

Suite à la mise au point et à la description par le laboratoire du modèle *in vitro* humain de granulome fongique à *C. albicans* (Alvarez-Rueda *et al.* 2012), nous avons voulu confirmer mais aussi approfondir les résultats précédemment obtenus avec *C. albicans* et ce avec une nouvelle série de sujets. Nous avons également voulu observer si d'autres espèces de *Candida* étaient capables d'induire une réaction granulomateuse ou si celle-ci été propre à *C. albicans*. Nous avons donc choisi d'étudier 8 espèces de *Candida* : *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida kefyr*, *Candida krusei*, *Candida lusitanae*, *Candida parapsilosis* et *Candida tropicalis*. Sept d'entre elles font parties des espèces les plus fréquemment isolées en pathologie humaine et ce, en se basant sur les données épidémiologiques, et *C. dubliniensis* a été choisie de par sa proximité phylogénétique avec *C. albicans* et de sa capacité à filamenter (**Figure 49**).

Les objectifs de cette étude ont été de définir les caractéristiques précises de cette réaction granulomateuse en termes d'intensité et de devenir de la réponse mais aussi de caractériser la dynamique et la composition immunologique du granulome à *Candida* afin, à terme, de mieux comprendre mais aussi de mieux caractériser la survenue des cas de granulomes fongiques à *Candida* en clinique.

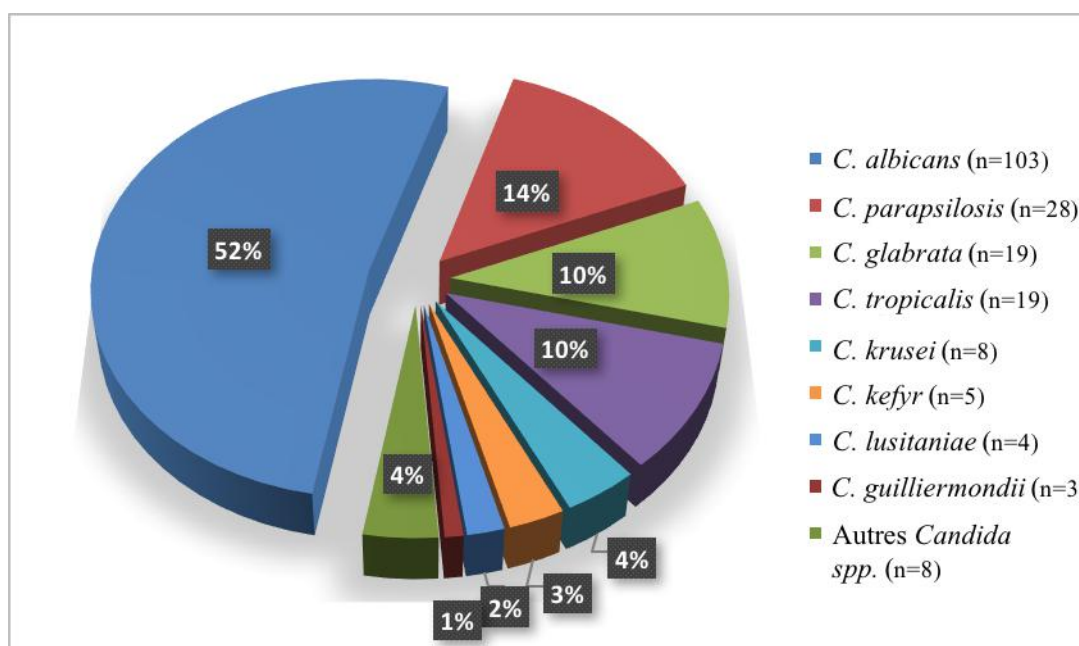


Figure 49 : Distribution des espèces de *Candida* responsables de candidémies (n=197 isolats) au CHU de Nantes entre 2004 et 2010 (d'après Tadec *et al.* 2016). Autres *Candida* spp. : *C. lipolytica* (n=2), *C. dubliniensis* (n=2), *C. inconspicua* (n=1), *C. pelliculosa* (n=1), *C. metapsilosis* (n=1) et *C. parapsilosis* sensu lato (n=1).

Afin de répondre à ces différentes questions, les cellules immunes périphériques (PBMCs et PNNs) de 10 sujets sains ont été infectées avec 32 isolats cliniques de *Candida* spp des 8 espèces choisies (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei* et *C. kefyr*). Pour chacune de ces espèces, 4 isolats cliniques différents provenant de la mycothèque du laboratoire IICiMed et isolés chez des patients du CHU de Nantes atteints de candidoses ont été testés. Nous avons ensuite suivi la dynamique de formation de la réponse granulomateuse en termes de taille et de nombre des granulomes, mais également en suivant les charges fongiques au sein de ces structures. La nature des différentes cellules immunitaires impliquées dans la formation des granulomes a été suivie par cytométrie en flux et la production des cytokines a aussi été mesurée.

Cette étude a montré que toutes les espèces de *Candida* étudiées induisent la formation de granulomes 6 jours post-infection mais que leurs tailles et charges fongiques respectives diffèrent selon l'espèce et que ces deux paramètres sont positivement corrélés. De plus, certaines caractéristiques phénotypiques, comme la formation d'hyphes et la vitesse de croissance, semblent contribuer à la persistance des levures au sein des structures granulomateuses.

Nous avons également mis en évidence une variabilité inter-individuelle de la réponse humaine contre *Candida* spp. En effet, une plus forte proportion de neutrophiles et des ratios élevés de lymphocytes T CD4⁺/CD8⁺ sont corrélés avec une production précoce d'IFN- γ et associés à un contrôle de l'infection. De façon inverse, la persistance de *Candida* semble résulter d'une surproduction de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-6, l'IFN- γ et le TNF- α .

Enfin, nous avons observé des sous-populations régulatrices de cellules NK et de lymphocytes T doubles positifs CD4^{lo}CD8^{hi} infiltrant tardivement les structures granulomateuses, ce qui semble correspondre avec la production d'IL-10 et de TNF- α .

Toutes ces données offrent un cadre pour expliquer les bases des évènements cellulaires guidant le contrôle ou bien la persistance fongique dans le cadre des candidoses chroniques.

Specific Human and Candida Cellular Interactions Lead to Controlled or Persistent Infection Outcomes during Granuloma-Like Formation

Barbara Misme-Aucouturier, Marjorie Albassier, Nidia Alvarez-Rueda, Patrice Le Pape

Département de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Université de Nantes,
Nantes Atlantique Universités,
EA1155-IICiMed, Institut de Recherche en Santé 2, Nantes, Pays de Loire, France

A delayed type of multicellular process could be crucial during chronic candidiasis in determining the course of infection. This reaction, consisting of organized immune cells surrounding the pathogen, initiates an inflammatory response to avoid fungal dissemination. The goal of the present study was to examine, at an *in vitro* cellular scale, *Candida* and human immune cell interaction dynamics during a long-term period. By challenging human peripheral blood immune cells from 10 healthy donors with 32 *Candida albicans* and non-*albicans* (*C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, and *C. kefyr*) clinical isolates, we showed that *Candida* spp. induced the formation of granuloma-like structures within 6 days after challenge, but their sizes and the respective fungal burdens differed according to the *Candida* species. These two parameters are positively correlated. Phenotypic characteristics, such as hypha formation and higher axenic growth rate, seem to contribute to yeast persistence within granuloma-like structures. We showed an interindividual variability of the human response against *Candida* spp. Higher proportions of neutrophils and elevated CD4⁺/CD8⁺ T cell ratios during the first days after challenge were correlated with early production of gamma interferon (IFN- γ) and associated with controlled infection. In contrast, the persistence of *Candida* could result from upregulation of proinflammatory cytokines such as interleukin-6 (IL-6), IFN- γ , and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) and a poor anti inflammatory negative feedback (IL-10). Importantly, regulatory subsets of NK cells and CD4^{lo}CD8^{hi} doubly positive (DP) lymphocytes at late stage infiltrate granuloma-like structures and could correlate with the IL-10 and TNF- α production. These data offer a base frame to explain cellular events that guide infection control or fungal persistence.

Introduction

Candidiasis still constitutes a global health threat. The annual invasive candidiasis incidence reported by international population-based studies has been estimated at 1.5 to 8 per 100,000 (1; <http://www.gaffi.org>). The global mortality rate of bloodstream infections (BSI) varies between 30 and 50% (2). *Candida* species have coevolved with humans, colonizing different body sites such as the gastrointestinal mucosa, genitourinary system, and skin microbiota (3, 4). In healthy individuals, complex relationships between some *Candida* species and the human immune system make the fungus a harmless commensal. Prominent features such as the yeast genetic background, the ability of some species to reversely switch from yeast to hyphae, and the quality of antifungal immune responses at different anatomical sites guide host-fungus interaction. With the continued progress in the understanding of innate immune sensing of *Candida* spp., it is now clear that a balanced host-fungus interaction is a condition for *Candida* commensalism (5–8). *Candida* infections occur in patients with specific risk factors, especially a dysfunction of the innate immune system such as neutropenia or a disruption of physical barriers, leading to the dissemination of *Candida*. The *Candida* species of major clinical importance are *Candida albicans* and other non-*albicans* *Candida* spp. (NACs) such as *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. lusitaniae*, *C. krusei*, and *C. kefyr* (9–11). A low frequency of infections by *C. dubliniensis* has also been described for neutropenic patients, but the mortality is higher than with other NACs (12). The spectrum of clinical manifestations of candidiasis includes cutaneous, mucosal, systemic, and disseminated candidiasis. Disseminated infections may be either acute or chronic depending on the onset of fungemia and organ dissemination.

Thanks to the recent publication of the revolutionary concept of a damage response framework (DRF) from the perspective of candidiasis, it has become clear that host and *Candida* interaction is a more complex outcome. It is now well established that infections can be raised not only because of host-mediated damage but also because of fungus-mediated damage or both (13). Remarkable advances in the understanding of the pathophysiology of *Candida* infections highlight that multiple cell populations are involved in the anti-*Candida* response. Furthermore, innate and adaptive immune requirements for human defense are specific and compartmentalized between mucosal and systemic infections (14, 15). It is well accepted that anti-*Candida* responses require the coordinated action of neutrophil and macrophage phagocytosis that can clear the fungus and further activate the release of proinflammatory cytokines, which protect from fungal dissemination. Dendritic cells, natural killer cells, and B and T lymphocytes (CD4 and CD8) also play central roles (16–21).

In the context of chronic disseminated candidiasis, the delayed multicellular inflammatory process could be particularly essential to manage fungal clearance, to protect the surrounding healthy tissue, and to prevent fungal persistence. Granulomas, which correspond to a focal area of granulomatous inflammatory reaction, are composed of blood-derived infected and uninfected macrophages, differentiated macrophages (epithelioid cells), and multinucleated giant cells, surrounded by a ring of T and B lymphocytes. Granuloma formation during *Candida* dissemination in humans is occasionally described, and its role in pathophysiology has not been well investigated. During invasive candidiasis, at-risk patients develop suppurative inflammation with rare granulomas lesions in different organs (22). Histopathologic descriptions of microabscesses and/or sparse granulomas have been reported for the liver, spleen, kidneys, and brain (23–27). Hepatic lesions are usually characterized by areas of central necrosis or fibrosis, surrounded by granulation tissue, macrophages, fibroblasts, and multinuclear giant cells (27). While these delayed multicellular reactions are clinically rare during candidiasis, they could play a role in controlling infection at local tissue levels. A better dissection of these reactions could allow the identification of fungal and human determinants of clearance or persistence.

Experimental animal models have yielded a tremendous amount of information about *C. albicans* pathogenesis. These clinically relevant models have been particularly useful to study systemic candidiasis. In these models, *C. albicans* dissemination causes extensive disease, mostly in the kidneys, that are also characterized by multiple compact immune infiltrates (28–30). *In vitro* studies describing the infection of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) are complementary to animal models giving information about *Candida* pathogenesis in the context of human-like environments. The *in vitro* models have been particularly useful to study pathogenesis and virulence factors of *Candida* spp. (31–36). Human PBMC-related *in vitro* models have been validated for the study of *Mycobacterium tuberculosis* and *Schistosoma mansoni* granuloma-like structures. They recapitulate the complexity of host responses and mimic the microenvironment encountered by the pathogen within the human granuloma-like structures (37–39).

We have previously set up an *in vitro* model to recreate the multicellular interaction of human immune cells with *C. albicans* (40). In this study, we aimed to address the gap in knowledge about the relevance of these dense immune infiltrates by analyzing other clinical relevant *Candida* species. We then analyzed at a cellular level the dynamics of immune infiltrate formation over time by challenging peripheral mononuclear and polymorphonuclear human leukocytes from 10 healthy donors with 32 *C. albicans* and NAC clinical isolates.

Morphometric analyses of cellular interactions in terms of size and granuloma-like structure number, fungal burden, immune cell dynamics, and cytokine profiles were carried out. The data should provide a baseline to explain cellular events conditioning infection control or fungal persistence outcomes.

Results

***Candida* spp. induced the formation of dense immune infiltrates within 6 days after challenge.** Peripheral mononuclear and polymorphonuclear blood cells from 10 healthy immunocompetent subjects were challenged with 32 clinical isolates from eight *Candida* species. Cell cultures were maintained for up to 6 days postinfection, and the occurrence of immune infiltrates was quantified every 2 days by light microscopy observation.

Both uninfected and infected conditions showed monolayers of cells 2 days postinfection. Cellular aggregation was visible 4 days after challenge. Between days 4 and 6, distinguishable multicellular and multilayered structures characteristic similar granuloma-like structures were identified under infection conditions. At that time, the 32 clinical isolates of *Candida* spp. were able to induce dense aggregates. Figure 1A shows representative compact immune infiltrates observed with each of the eight *Candida* species 6 days after challenge. On day 4 postinfection, the average number of these structures was between 2.5 (*C. kefyr*) and 7.4 (*C. albicans*) per cm³ (Fig. 1B). On day 6, the number of structures increased for all species, with no significant differences compared to those on day 4 ($P = 0.05$). The formation of these structures against *Candida* spp. also varied depending on the donor subject. Figure 1C shows that subjects S1, S2, S3, S4, S6, and S7 developed granuloma-like structures on day 4 after infection. The number of these structures increased between 2.7- and 10-fold on day 6 postinfection. In contrast, a proportion of subjects (S5, S8, S9, and S10) developed significantly fewer immune infiltrates during the 6 days of infection culture. Unchallenged cultures from the same subjects, used as negative controls, exhibited no specific aggregates within 6 days.

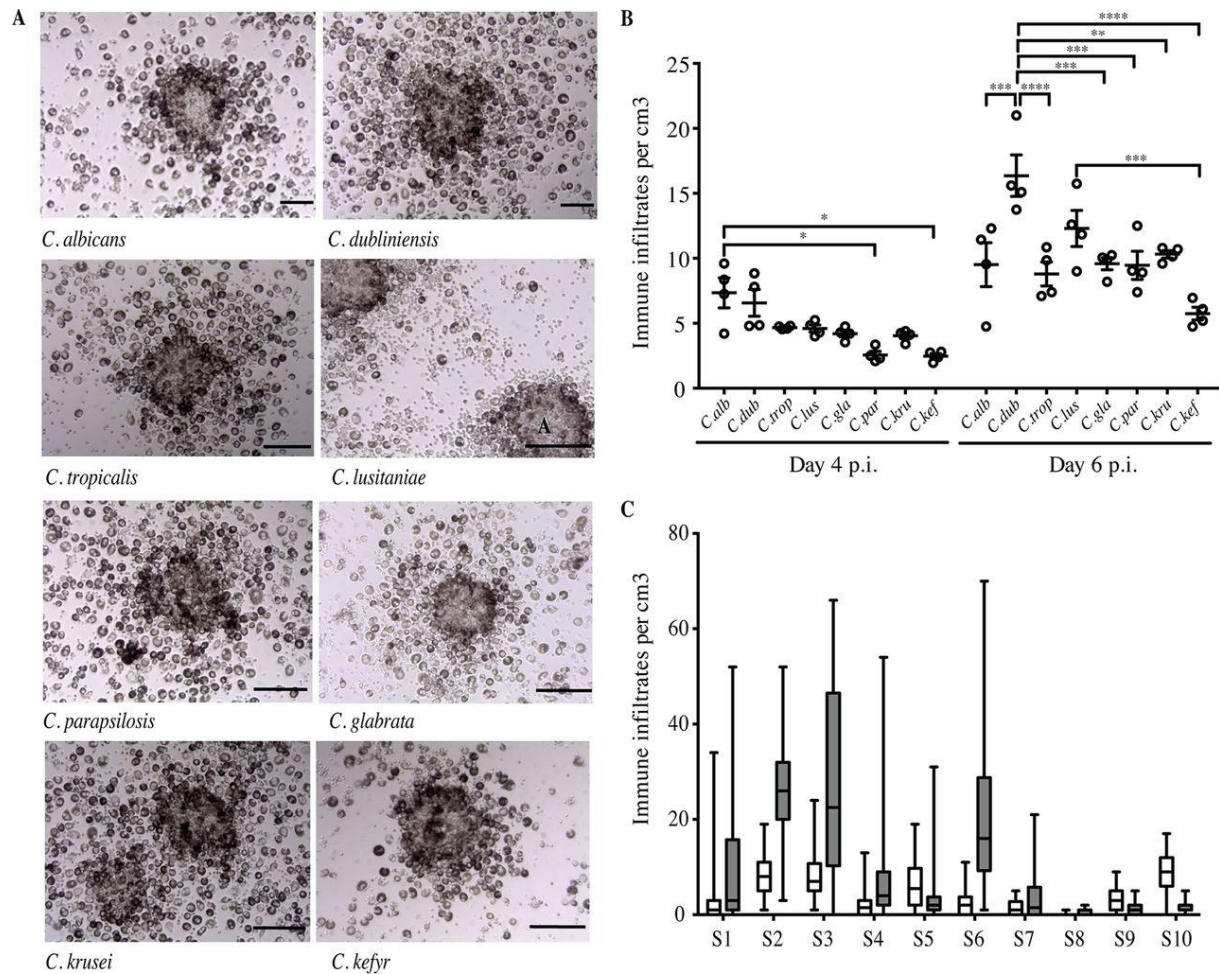


FIG 1 *In vitro* immune infiltrates induced by *Candida* spp. after infection of human immune cells from immunocompetent subjects. (A) Representative immune infiltrates observed under light microscopy 6 days after challenge of human mononuclear and polymorphonuclear peripheral blood cells with living yeasts from annotated *Candida* species (MOI, phagocyte-to-yeast ratio of 2,000:1). Bars represent 50 μ m. No formation of immune infiltrates was observed in uninfected conditions for up to 6 days postinfection (p.i.). (B) Number of immune infiltrates per cubic centimeter on days 4 and 6 postinfection by the eight *Candida* species. Each dot represents the mean of the number of structures per cubic centimeter for one clinical isolate and for all studied subjects. Lines indicate SEM (*, P between 0.045 and 0.0360; **, $P = 0.0017$; ***, P between 0.0004 and 0.0002; ****, $P = 0.0001$; $\alpha = 0.05$). *C.alb*, *C. albicans*; *C.dub*, *C. dubliniensis*; *C.trop*, *C. tropicalis*; *C.lus*, *C. lusitaniae*; *C.gla*, *C. glabrata*; *C.par*, *C. parapsilosis*; *C.kru*, *C. krusei*; *C.kef*, *C. kefyr*. (C) Box plots depict median, minimum, and maximum immune infiltrate numbers for each donor subject (S) on days 4 (white boxes) and 6 (gray boxes) postinfection ($n = 80$).

The size of immune infiltrates structures induced by *Candida* spp. progressively increased over time. The size of immune infiltrates was quantified under light microscopy during the incubation time. They were measured on days 4 and 6 postinfection, since multicellular interactions consistently showed cellular aggregation at these time points. The average sizes of the immune infiltrates induced by the 32 clinical isolates of eight *Candida*

species after challenge of 10 subjects were similar when measured 4 days postinfection (mean size of 63 μm) (Fig. 2A). Two days later, the relative sizes of immune infiltrates were unchanged for *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, and *C. kefyr* (Fig. 2A). In contrast, for *C. albicans* and *C. dubliniensis*, the sizes of immune infiltrates were significantly higher than for the six other species (208 μm and 163 μm , respectively). At that time, light microscopic observation of these structures derived from *C. albicans* and *C. dubliniensis* showed the development of some spreading hyphae and pseudohyphae. As shown in Fig. 2B, differences in the magnitude of recruitment were generally observed when cell aggregation occurred around these filaments. Time-lapse imaging of *C. albicans*-green fluorescent protein (GFP) cocultures also showed the fusion of compact immune infiltrates formed around filaments, giving rise to larger structures (see Videos S1 and S2 in the supplemental material). Despite interindividual variability in the numbers of immune infiltrates generated by *Candida* spp., no significant difference was observed between subjects regarding the structure size.

Size of immune infiltrates induced by *Candida* spp. was positively correlated with fungal burden. We next explored whether immune infiltrates sizes were related to the fungal burden for all the clinical isolates of *Candida* spp. Overall, a significant positive correlation was observed between the average size of immune infiltrates and the fungal burden on day 6 postinfection, with a high Spearman's correlation coefficient ($\rho = 0.8571$; $P = 0.0107$) (Fig. 2C). Therefore, *C. albicans* and *C. dubliniensis*, which induced large immune infiltrates, were associated with a high fungal burden, reflecting an *in vitro* uncontrolled infection. Conversely, the range of immune infiltrate sizes observed with the other species was directly correlated with a lower fungal burden.

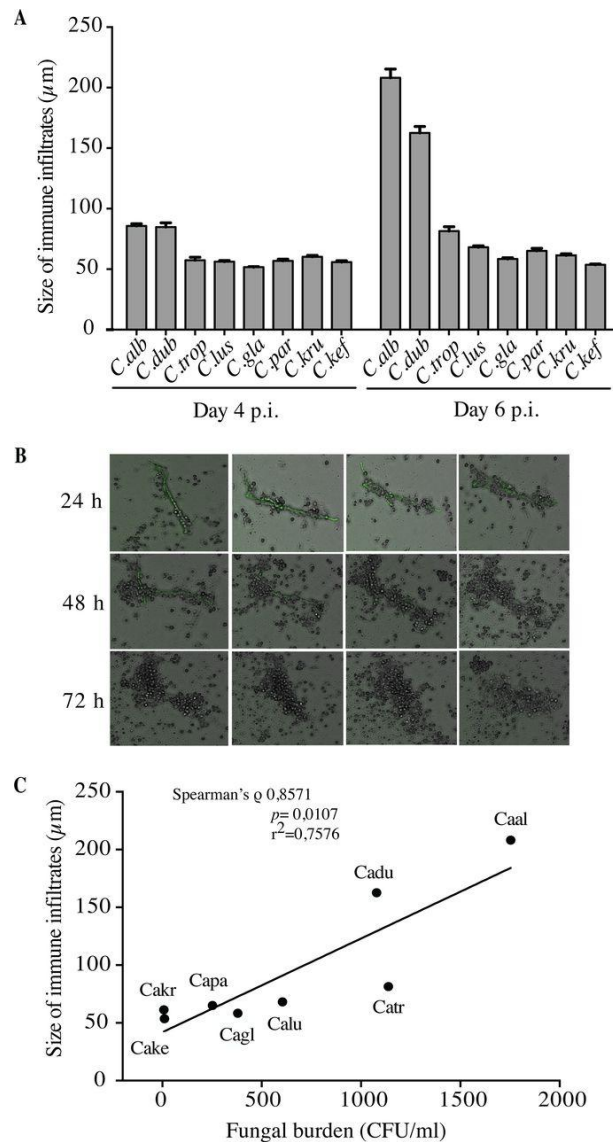


FIG 2 Dynamics of immune infiltrate size according to *Candida* species. (A) Human mononuclear and polymorphonuclear peripheral blood cells from donors were infected with *Candida* spp. for up to 6 days. The size of immune infiltrates was measured by light microscopy on days 4 and 6 postinfection. The data are presented as the mean \pm SEM of structure sizes from 10 subjects for 32 clinical isolates of *Candida* species 6 days postinfection. (B) Coculture analysis by time-lapse video imaging. Human peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells were infected with *C. albicans* cells at an MOI of 2,000:1. Cell aggregation was followed for 72 h, and a capture was done every 10 min. Bars represent 50 μ m. (C) Pairwise correlation of immune infiltrates size and fungal burden. Shown is a graphical representation of the fungal burden means (x axis) and immune infiltrate size (y axis) 6 days postinfection. The line indicates the slope.

The dynamics of the fungal burden within immune infiltrates were different between *Candida* species. After infection of human immune cells, the dynamics of the fungal burden was assessed by a colony counting method for up to 6 days. The results for the global fungal burden were expressed as the mean CFU per milliliter for the 32 clinical isolates and the 10 subjects. They showed a reduction of the fungal growth during the first 3 days postinfection

for all *Candida* isolates. Then, the surviving yeasts were responsible for a significant and rapid increase in the fungal burden from the fourth to the sixth day postinfection (Fig. 3A). Interestingly, when it was analyzed at the species level, a strong variability in the fungal burden was identified on days 4 and 6 postinfection, reflecting a high interspecies variability of the phenomenon (Fig. 3A; Table 1).

Higher axenic *Candida* growth rates contributed to yeast persistence within immune infiltrates. We next explored the influence of the growth rate of the *Candida* species on their ability to persist within immune infiltrates. The growth rate of 32 *Candida* isolates was measured under the same culture conditions as those for coculture studies. Figure 3A shows the generation time for each of the studied species. *C. albicans* and *C. tropicalis* showed short generation times (7.183 ± 0.834 h and 7.850 ± 0.881 h, respectively). In contrast, *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *C. lusitaniae* showed similar generation times (13.997 ± 1.447 h, 10.954 ± 1.078 , 13.313 ± 0.677 h, and 21.933 ± 3.923 h, respectively). The generation times of *C. kefyr* and *C. krusei* were higher than for the other species (22.137 ± 3.675 h and 37.449 ± 5.037 h, respectively).

We further evaluated the relationship between growth rate and fungal burden in immune infiltrates. A correlation analysis was performed between the mean of the fungal burden during axenic growth tests and the mean of the fungal burden in immune infiltrates on day 6 of incubation for each of the 32 clinical isolates. Figure 3B shows a significant direct correlation between the growth rate of *Candida* species and their ability to persist within immune infiltrates ($\rho = 0.775$; $P < 0.0001$; $r^2 = 0.4974$).

A two-way analysis of variance (ANOVA) highlighted remarkable differences in yeast proliferation profiles among these species; they were thus classified into three groups according to all of the parameters analyzed. Group A comprised *Candida* species showing high proliferation rates between days 4 and 6 postinfection. *C. albicans*, *C. dubliniensis*, and *C. tropicalis* actively escaped from immune infiltrates by forming blastoconidia, hyphae, or pseudohyphae. Human immune cells from the subjects poorly controlled this fungal proliferation (median fungal burden of 1,300 CFU/ml). The fungal burden dynamics of group B (*C. lusitaniae*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis*) was similar to those for group A. However, the mean of the fungal burden was significantly lower than for group A (400 CFU/ml). *C. krusei* and *C. kefyr* formed group C, characterized by the progressive decrease in the fungal burden from day 0 to up to 6 days postinfection. Immune infiltrates from those subjects

controlled the fungal burden better over time (Fig. S1). We then analyzed whether clinical isolates had an effect on fungal burden dynamics for each *Candida* species. The results showed that the fungal burden dynamics within immune infiltrates was not significantly different between the four clinical isolates from each *Candida* species (Fig. S2 and S3).

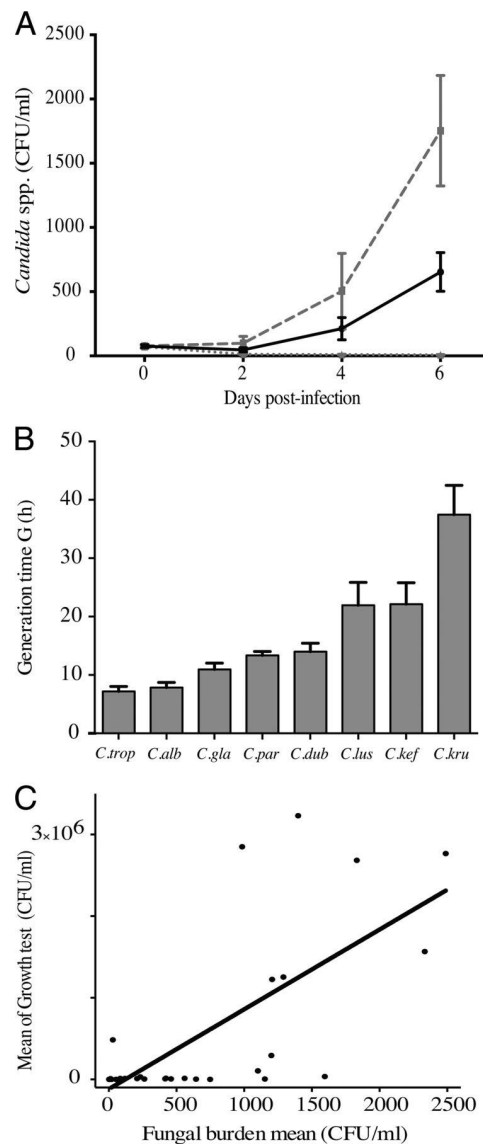


FIG 3 Dynamics of *Candida* proliferation within immune infiltrates. (A) The fungal burden was determined at 0, 2, 4, and 6 days postinfection. Data are the means \pm SEM of the fungal burden of 32 clinical isolates of *Candida* from immune infiltrates of 10 subjects. The black line represents the mean \pm SEM of the fungal burden of 32 clinical isolates of *Candida* and of 10 subjects. The gray dashed line represents the mean \pm SEM of the fungal burden of *C. albicans* immune infiltrates, while the gray dotted line shows the mean \pm SEM of the fungal burden of *C. krusei* immune infiltrates. (B) Generation time (G) and growth analysis of *Candida* species isolates. Shown are means \pm SEM for generation time for *Candida* species. (C) Significant positive correlation between mean of growth test after 6 days and mean of fungal burden on day 6 after infection.

TABLE 1 Dynamics of fungal burden within granuloma-like structures for *Candida* species

Species	Fungal burden mean, CFU/ml (SEM), on indicated day		
	2	4	6
<i>C. albicans</i>	98.7 (53)	503 (294)	1,753 (429)
<i>C. dubliniensis</i>	31 (19)	355 (300)	1,078 (403)
<i>C. tropicalis</i>	71 (35)	379 (177)	1,137 (351)
<i>C. lusitaniae</i>	29 (8.4)	118 (52)	604 (264)
<i>C. parapsilosis</i>	47 (19)	150 (85)	252 (118)
<i>C. glabrata</i>	71 (22)	171 (66)	380 (148)
<i>C. kefyr</i>	14 (5.4)	7.6 (3.2)	10 (5.7)
<i>C. krusei</i>	12.9 (3.9)	10 (2.8)	7.8 (2.3)

The histological analyses of *Candida*-induced immune infiltrates exhibit a cellular composition similar to granuloma-like structures. Light microscopy observation of cocultures 6 days after challenge showed immune infiltrates with large zones of focal cell migration (CM). Isolation of these compact immune reactions after washing of nonassociated cells allowed the study of compact inflammatory aggregates (IA) (Fig. 4A). The composition of *Candida*-induced immune infiltrates was analyzed at a cellular level after May-Grünwald-Giemsa staining. Figure 4B shows high-magnification images of fungal and immune components. These structures were characterized by the organized presence of fungal elements surrounded by macrophages, some multinucleated cells having two nuclei, foamy macrophages, and rare multinucleated giant cells and neutrophils. Lymphoid cells were mainly present at the periphery, nearly in contact with macrophages. At this stage, *Candida*-induced immune infiltrates exhibited characteristics similar to those of granuloma-like structures. Time-lapse and confocal microscopy examination confirmed that inner fungal elements of *C. albicans*-GFP produced filamentation and disseminated from these granuloma-like structures (Fig. 4C).

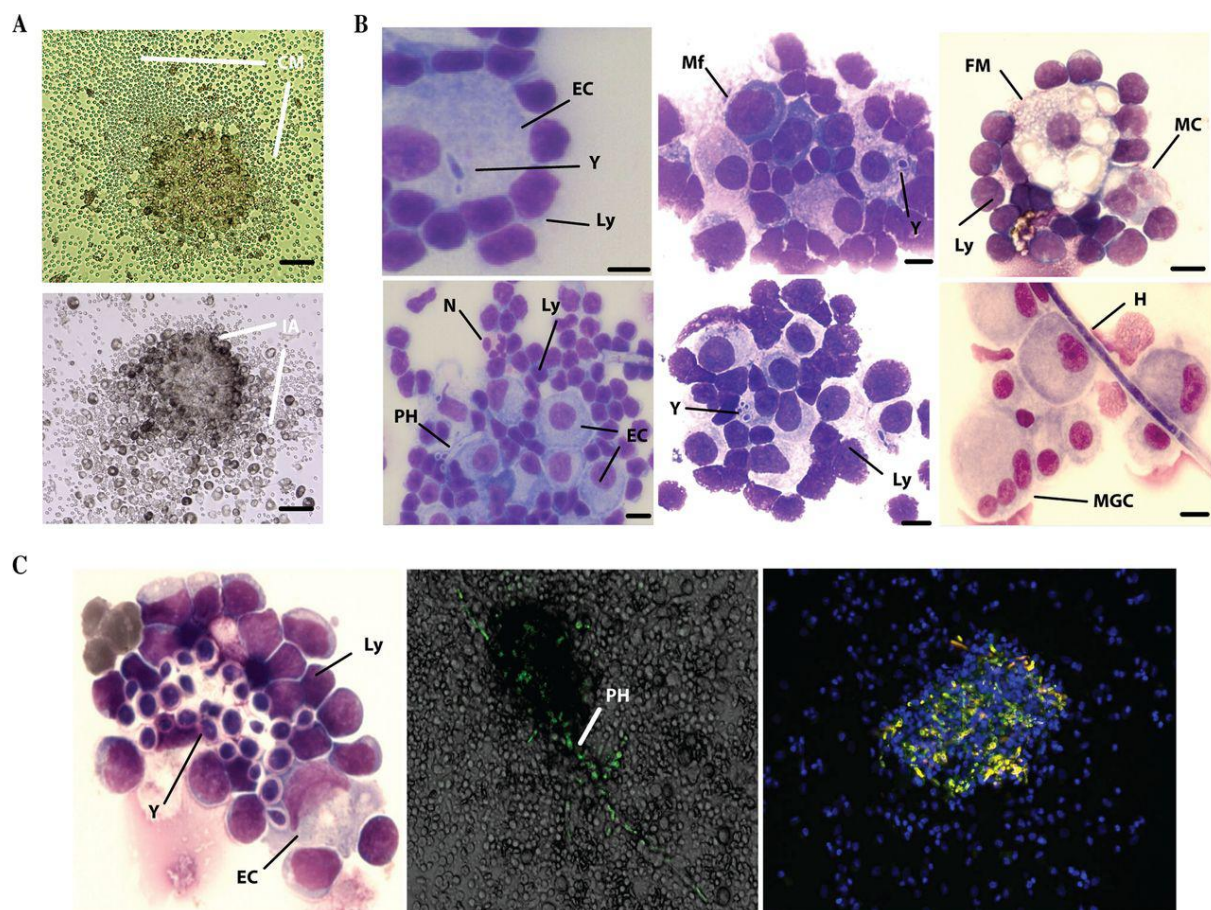


FIG 4 Histological examination of immune infiltrates induced by *Candida* spp. (A) Light microscopy observation of immune infiltrates and cell migration gradients (CM) 6 days postinfection. Cells were washed twice in PBS, and remaining compact inflammatory aggregates (IA) were analyzed. Scale bar: 50 μ m. (B) May-Grünwald-Giemsa staining of immune aggregates 6 days after infection. Y, yeasts; PH, pseudohypha; H, hypha; Mf, activated macrophages; EC, large activated macrophages; MC, multinucleated cells with two nuclei; FM, foamy macrophages; MGC, multinucleated giant cells; N, neutrophils; Ly, lymphoid cells. Bars represent 20 μ m. (C) Time-lapse and confocal microscopy examination of granuloma-like structures. Human immune cells were incubated with GFP-tagged *C. albicans* under the same coculture conditions as described in the text. Nuclear DNA was stained with Hoechst. Fluorescence-stained sections were examined under a Nikon A1 RSI microscope at a magnification of x20 and constant Z-steps, and 3D images were processed with NIS elements version 3.21 and Volocity 3D image analysis software version 6.01.

The abilities of human granuloma-like structures to control *Candida* infection were different between subjects. We assessed whether the immune response of 10 healthy subjects had an impact on *Candida* proliferation within granuloma-like structures. Whereas immune cells from all subjects actively controlled all *Candida* proliferation during the first 3 days postinfection, an interindividual variability was observed in the response to the different *Candida* species between days 4 and 6 after challenge (Fig. 5). A cutoff was established to describe the ability of immune cells from subjects to control the infection or progressively be

infected up to 6 days postinfection. The response of granuloma-like structures from subjects who exhibited a lower fungal burden than 100 CFU/ml on day 6 postinfection was referenced as controlled infection (CI). When the fungal burden was higher than 100 CFU/ml, granuloma-like structures from these subjects were defined as persistent infection (PI). The CFU per milliliter (mean \pm standard error of the mean [SEM]) for each subject and each *Candida* species was compared to those for species that controlled infection (*C. krusei* and *C. kefyr*). As shown in Fig. 5A, structures poorly controlled the fungal burden of *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis*. For *C. albicans*, only two subjects were able to clear the infection. In contrast, granuloma-like structures from all of these subjects were able to control infection by *C. krusei* and *C. kefyr*, and six of them were able to clear the infection completely (Fig. 5B).

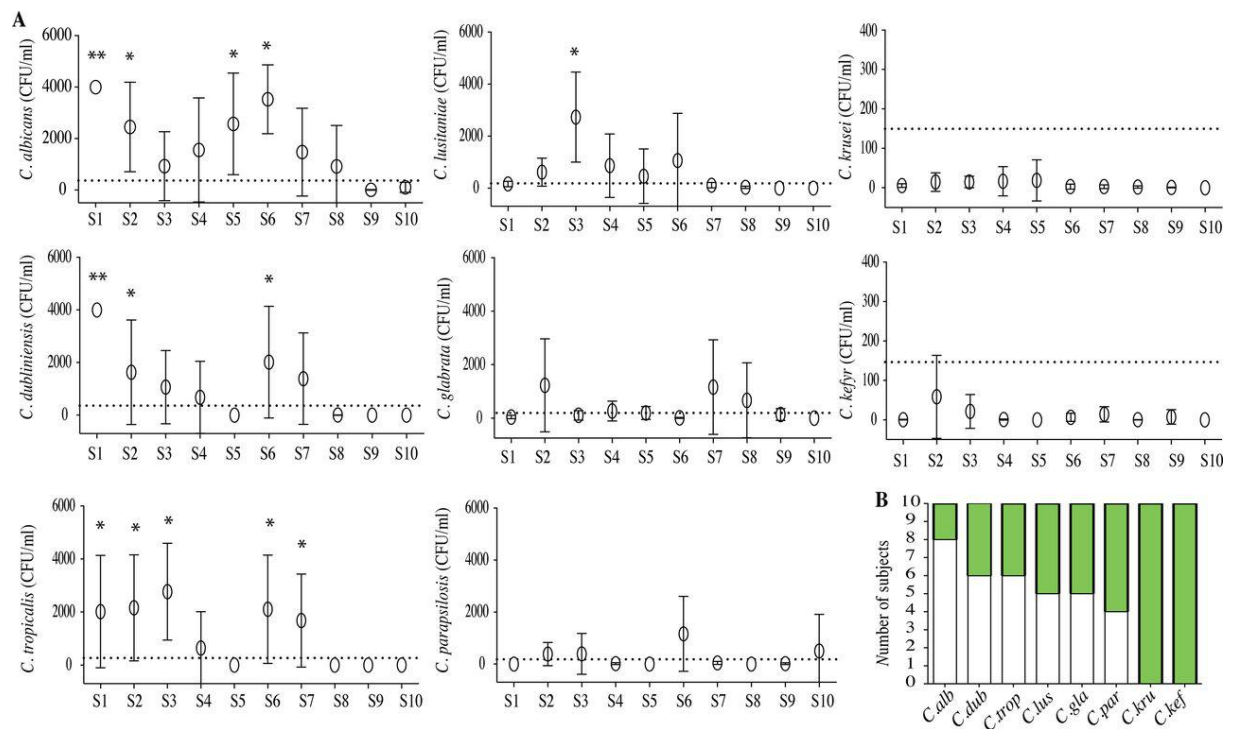


FIG 5 Interindividual variability of the response against *Candida* spp. The variability of the subjects' response against *Candida* infection was studied after infection of human peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells with living yeasts from different *Candida* species. (A) Fungal burden 6 days postinfection. Results are expressed as the mean \pm SEM of the fungal burden of 4 *Candida* clinical isolates from each species for each subject (S1 to S10). Dotted lines indicate the arbitrary cutoff of 100 CFU/ml. The mean \pm SEM for each subject and each *Candida* species were compared to the mean \pm SEM of species that controlled infection (mean of *C. krusei* and *C. kefyr*). *, P 0.05; **, P 0.001. (B) Number of subjects showing a persistent-infection (white bars) or controlled-infection (green bars) status.

The percentage and recruitment of phagocytic cells against *Candida* spp. were different between the controlled-infection and persistent-infection statuses. To assess whether the host immune cells had an impact on the dynamics of *Candida* fungal burdens, several flow cytometry assays of granulocyte subsets within granuloma-like structures over time were performed. CD66+ neutrophils from granulocyte region I and CD14+ monocytes were gated from monocyte region II. Results are expressed as the percentages of CD66+ and CD14+ from the total living cell compartment over time (Fig. 6A).

The kinetics of phagocytic cells after infection with each *Candida* isolate were similar between persistent-infection and controlled-infection granuloma-like structures. They were characterized by a progressive and significant reduction in the percentage of CD66+ cells on days 2, 4, and 6 compared to that on day 0 (Fig. 6B; Tables S1 and S2). Interestingly, in granuloma-like structures in which the infection was controlled, the initial mean percentage of CD66+ cells at the moment of the challenge (day 0) was significantly higher (55%) than in persistent-infection granuloma-like structures (40%) (Fig. 6C). Two days postinfection, the relative percentage of CD66+ cells reflected a 22% decrease when infection was controlled. However, during persistent infection, the CD66+ cell percentage was reduced more (35% decrease; $P = 0.0002$ versus controlled infection) (Fig. 6C).

In contrast to the case with CD66+ cells, there was no significant difference in the percentage of CD14+ on day 0 between persistent-infection and controlled-infection granuloma-like structures. The CD14+ cells also decreased over time after *Candida* infection. Interestingly, differences in the dynamics of CD14+ cells were observed between the persistent-infection and controlled-infection statuses (Fig. 6D). Four days after challenge, in persistent-infection granuloma-like structures, the percentage of CD14+ cells significantly decreased by 27% ($P = 0.001$ versus day 0). In contrast, this cell subset did not significantly decrease in controlled-infection granuloma-like structures (3%; $P = 0.7$ versus value for day 0). Overall, 4 days after infection, the relative proportion of CD14+ cells was significantly higher for the controlled-infection than for the persistent-infection status (Fig. 6E).

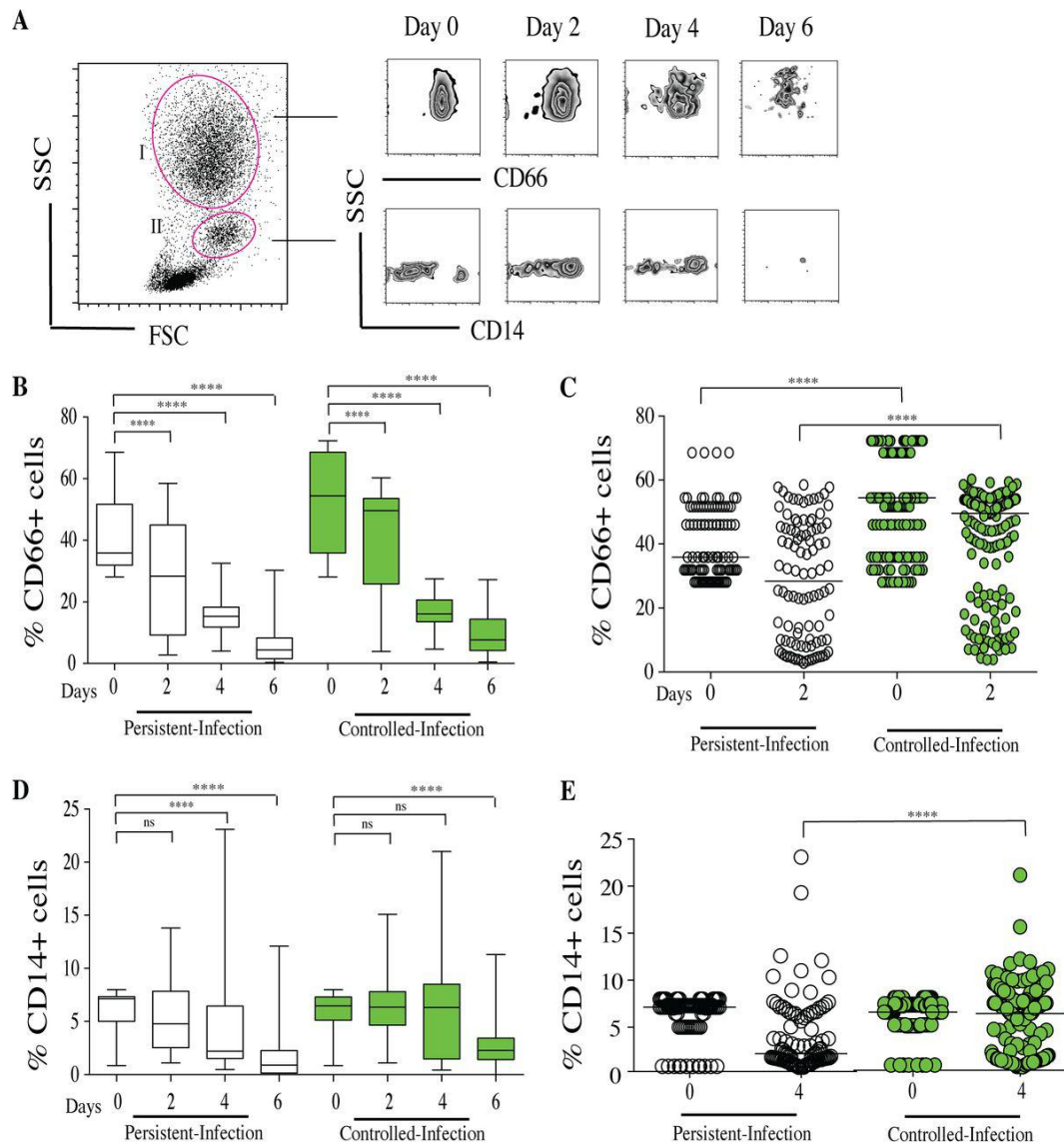


FIG 6 Characterization of CD66+ and CD14+ cell proportions within *Candida* granuloma-like structures over time. Peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells from 10 healthy subjects were infected with 32 *Candida* clinical isolates for up to 6 days. The granuloma-like structures were collected from coculture plates at different time points and stained with a cocktail of fluorescence-conjugated antibodies specific to CD66 neutrophils and CD14 monocytes. (A) Representative flow cytometry analysis showing a side-scatter (SSC) versus forward-scatter (FSC) plot of granulocyte (I) and monocyte (II) selection. CD66+ cells were gated from region I, and CD14+ monocytes were gated from region II. (B) The proportions of CD66+ cells within granuloma-like structures are expressed as percentages of the total living cell compartment. Box plots depict median, minimum, and maximum percentages of CD66+ cells in persistent-infection and controlled-infection subjects. (C) Scatter plot of CD66+ proportions according to persistent-infection and controlled-infection status. (D) The proportions of CD14+ cells within granuloma-like structures are expressed as a percentage of the total living cell compartment. Box plots depict median, minimum, and maximum percentages of CD14+ cells according to persistent-infection and controlled-infection status. (E) Scatter plot of CD14+ cells proportions. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.0001$; ****, $P < 0.00001$ (by one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparison test) ($n = 320$). ns, not significant.

CD56⁺ natural killer cells decreased in granuloma-like structures from subjects with controlled infection. CD56⁺ NK cells were gated from the human lymphocytes (region III). After gating on CD3 lymphocytes, CD56⁺ cells were gated from the CD3⁻ population (Fig. 7A). The proportions of CD56⁺ cells were expressed as the mean percentages of CD56⁺ cells from the total CD3⁻ compartment. The kinetics of CD56⁺ cells after infection with each *Candida* isolate were similar between persistent-infection and controlled-infection granuloma-like structures. There was no significant difference in the percentage of CD56⁺ cells on day 0 between the persistent-infection and controlled-infection statuses. The dynamics was characterized by a significant reduction in the percentage of CD56⁺ cells 6 days after challenge compared to day 0. Interestingly, in controlled-infection granuloma-like structures, the reduction in CD56⁺ cell percentage was significant from day 4 to day 6 (Fig. 7B). Six days postinfection, the relative proportions of CD56⁺ were lower in controlled-infection granuloma-like structures (mean of 6%) than in persistent-infection granuloma-like structures (11%; $P = 0.00001$).

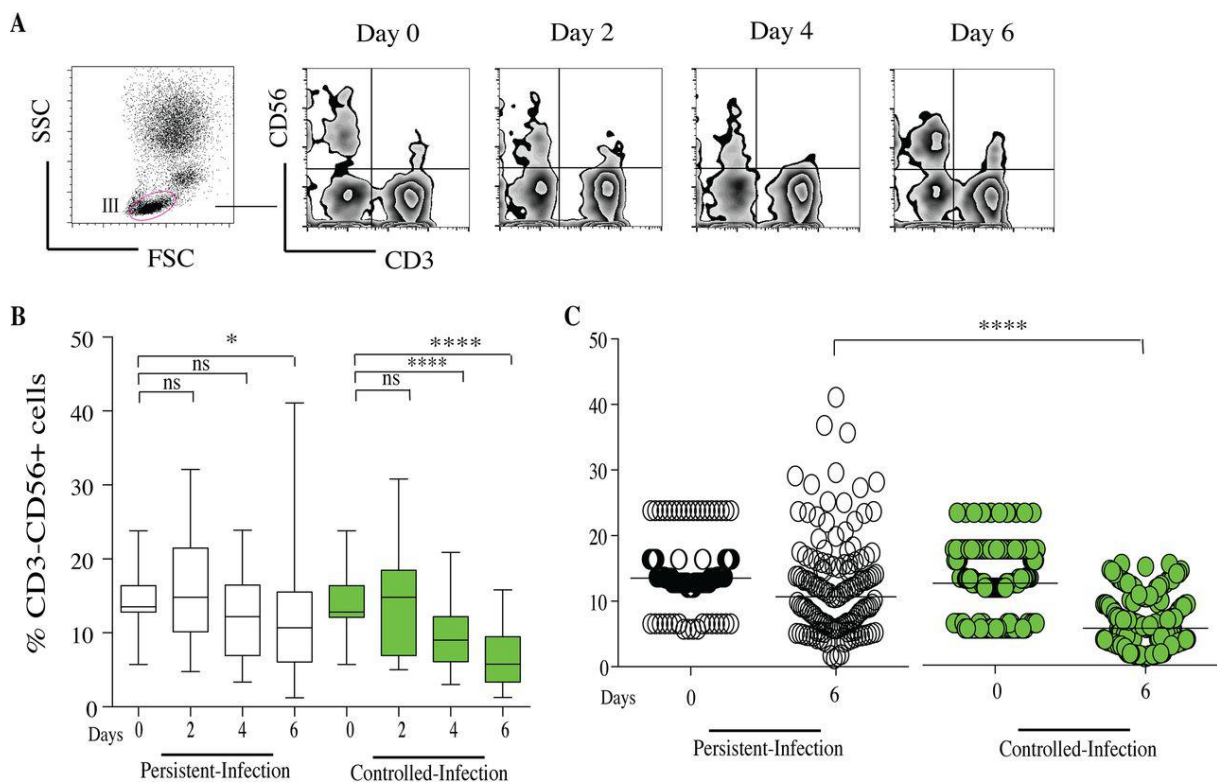


FIG 7 Characterization of CD56⁺ NK cells within *Candida* granuloma-like structures over time. Peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells from 10 subjects were infected with 32 *Candida* clinical isolates for up to 6 days. The granuloma-like structures were collected from coculture plates at different time points and stained with a cocktail of fluorescence-conjugated antibodies specific to CD3 and CD56 lymphocytes. (A) Representative flow cytometry analysis showing SSC versus FSC plot of lymphocytes in section III. The cells were analyzed over

time after gating on CD3 lymphocytes. Natural killer cells were gated as CD56+ from the CD3- population. (B) The proportions of CD56+ cells within granuloma-like structures are expressed as percentage of the total CD3- compartment. Box plots depict median, minimum, and maximum percentages of CD56+ cells in persistent-infection and controlled-infection granuloma-like structures. (C) Scatter plot of CD56+ NK cells proportions according to persistent- and controlled-infection status. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.0001$; ****, $P < 0.00001$ (by one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparison test) ($n = 320$).

The high CD4+/CD8+ T lymphocyte ratio contributed to controlling infection within granuloma-like structures. T lymphocytes were gated from human lymphocyte region III.

CD4+ and CD8+ T cells were gated from CD3+ T lymphocytes (Fig. 8A). The dynamics of CD4+ T cells were not significantly different over time between persistent-infection and controlled-infection granuloma-like structures (Fig. 8B). The infiltrating CD4+ cells were more abundant than CD8+ cells. The proportions of CD4+ T cells varied from 42% to 47% in persistent-infection granuloma-like structures. In controlled-infection granuloma-like structures, the CD4+ T cell proportions fluctuated between 45% and 53%. In contrast, the CD8+ T cell proportions significantly decreased between days 4 and 6 postinfection compared to those on day 0 in both granuloma-like structure types (Fig. 8C).

These kinetics of CD4+ and CD8+ T cells resulted in an increased CD4+/CD8+ ratio during the course of infection. Interestingly, this ratio remained significantly higher in controlled-infection than in persistent-infection granuloma-like structures (3.5 and 2.1, respectively) (Fig. 8D).

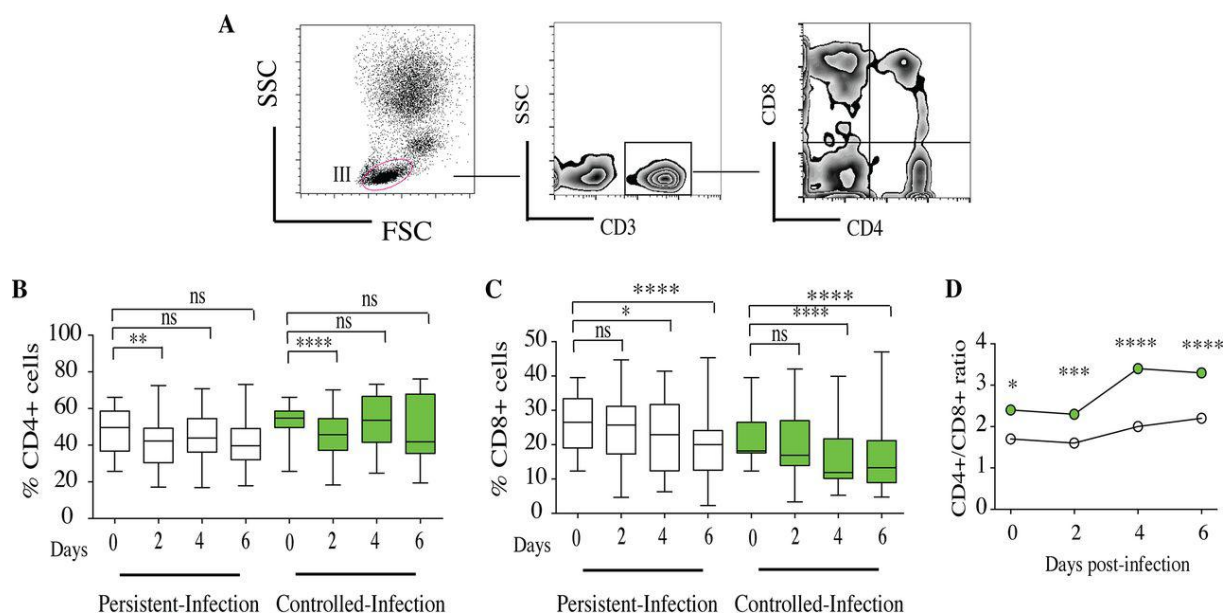


FIG 8 Characterization of CD4+ and CD8+ T cells within *Candida* granuloma-like structures over time. Peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells from 10 subjects

were infected with 32 *Candida* clinical isolates for up to 6 days. The granuloma-like structures were collected from coculture plates at different time points and stained with a cocktail of fluorescence-conjugated antibodies specific to CD3, CD4, and CD8 lymphocytes. (A) Representative flow cytometry analysis showing CD4⁺ and CD8⁺ cells over time after gating on CD3⁺ lymphocytes. (B and C) The proportions of CD4⁺ and CD8⁺ cells within granuloma-like structures are expressed as percentages of the total CD3⁺ compartment. Box plots depict median, minimum, and maximum percentages of CD4⁺ and CD8⁺ cells over time according to infection status. (D) Dynamics of CD4⁺/CD8⁺ cell ratio over time between persistent-infection and controlled-infection granuloma-like structures. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.0001$; ****, $P < 0.00001$ (by one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparison test) (n = 320).

Granuloma-like structures from persistent-infection status produced proinflammatory and anti-inflammatory cytokines. Cytokines were quantified during granuloma-like structure formation by collecting supernatants over time. We investigated the release of gamma interferon (IFN- γ), interleukin-10 (IL-10), IL-4, IL-6, IL-17A, IL-17F, and tumor necrosis factor alpha (TNF- α). The cytokine profiles between persistent- and controlled-infection statuses were compared. In persistent-infection granuloma-like structures, the IFN- γ levels were low between days 2 and 4 compared to those of untreated controls on day 0, before reaching 5.8 pg/ml on day 6. In contrast, in controlled-infection granuloma-like structures, IFN- γ reached this level 2 days postinfection and then progressively decreased between days 4 and 6.

In persistent-infection granuloma-like structures, IL-6 levels progressively increased between days 2 and 6 postinfection (9.8 pg/ml on day 2 and 45 pg/ml on day 6). In the same way, TNF- α levels significantly increased over time (3.5 pg/ml on day 2 and 51 pg/ml on day 6). Interestingly, IL-10 secretion also progressively increased (Fig. 9, white bars).

In controlled-infection granuloma-like structures, the dynamics of these cytokines were not significantly different from those on day 0, and they were significantly lower than in persistent-infection granuloma-like structures (Fig. 9, green bars). IL-4, IL-17A, and IL-17F cytokines were not significantly detected over time.

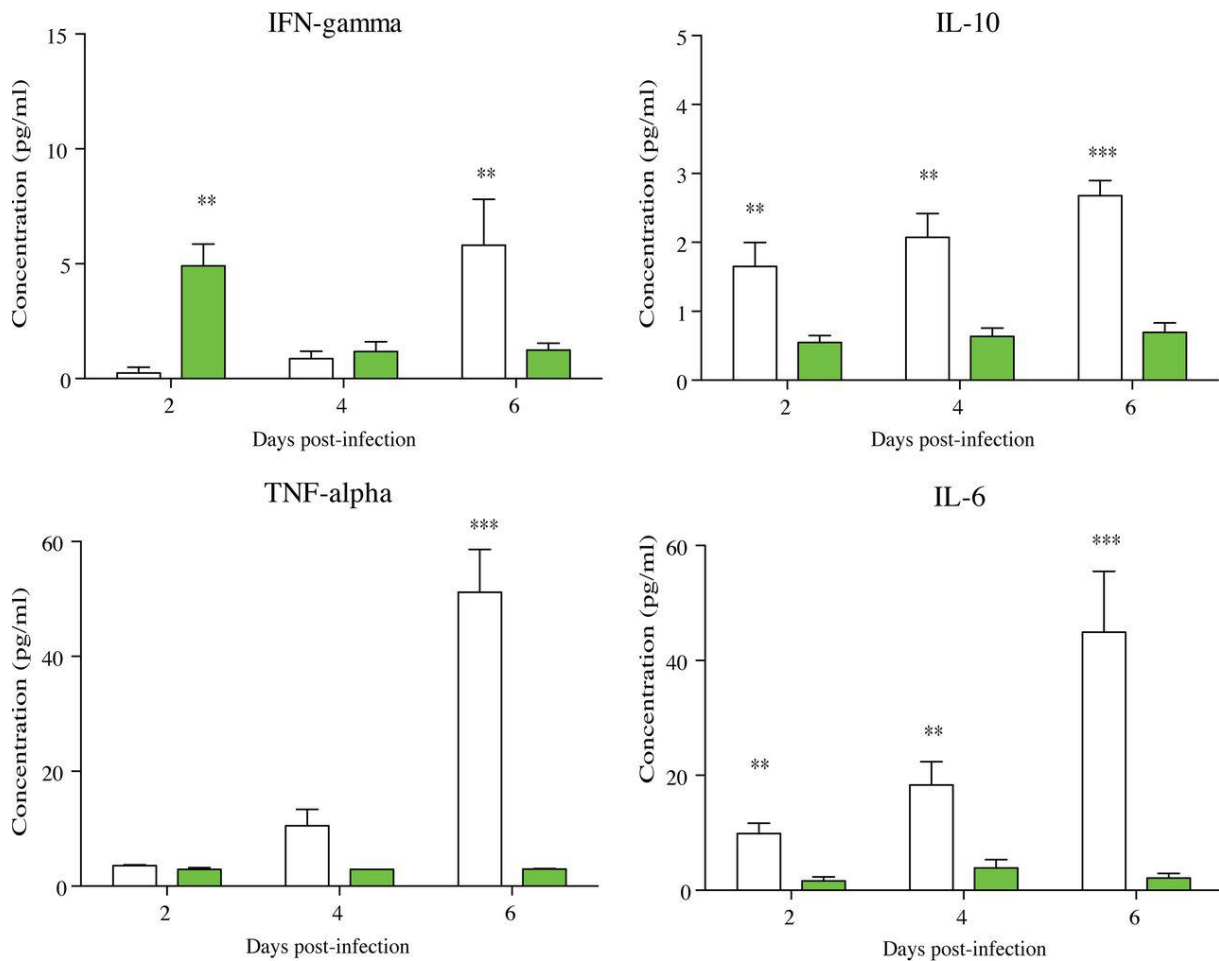


FIG 9 Cytokine profiles in persistent-infection and controlled-infection granuloma-like structures over time. Mean rates of IFN- γ , IL-10, IL-6, and TNF- α were compared between persistent-infection (white bars) and controlled-infection (green bars) granuloma-like structures by two-way ANOVA ($\alpha = 0.05$). *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.0001$.

***C. albicans*, *C. dubliniensis*, and *C. tropicalis* induced a specific T lymphocyte response in persistent-infection granuloma-like structures.** The link between *Candida* species and the establishment of a specific immune response within granuloma-like structures was examined. The composition of immune granuloma-like structures was analyzed according to groups A, B, and C. The dynamics of CD66+, CD14+, and CD56/ cells were not significantly different between *Candida* groups (Tables S1, S2, and S3), suggesting that these immune profiles were independent of the infecting *Candida* species. However, the analysis of CD4+ and CD8+ T lymphocyte dynamics showed specific signatures against *C. albicans*, *C. dubliniensis*, and *C. tropicalis* challenges (group A) compared to groups B and C (Fig. 10).

In persistent-infection granuloma-like structures from groups A, B, and C, the dynamics of CD4+ T cells was essentially unchanged during the course of infection, while CD8+ T cells significantly decreased. Although there were more CD4+ T cells in persistent-infection

granuloma-like structures from groups A and B, the T cell ratio was close to 2. In controlled-infection granuloma-like structures, the CD4⁺ T cells were somewhat more abundant during the 4th and 6th days postinfection, while CD8⁺ T cells were significantly reduced over time (Fig. 10A). The relative reduction in CD8⁺ T cells induced a temporary increase in the CD4⁺/CD8⁺ ratio. Interestingly, in controlled-infection granuloma-like structures from group A, the CD4⁺/CD8⁺ ratio was significantly higher than groups B and C (Fig. 10B).

To investigate the origin of the relative reduction in CD8⁺ T cell proportions 6 days postinfection, the CD4⁺ CD8⁺ doubly positive T cells in the CD3⁺ compartment were analyzed. Figure 10C depicts a representative analysis of double-positive T cells in the upper right quadrant. The proportions of CD4^{lo}CD8^{hi}, CD4^{hi}CD8^{hi}, and CD4^{hi}CD8^{lo} cells were determined over time after *Candida* infection. The average proportions of CD4^{hi}CD8^{hi} and CD4^{hi}CD8^{lo} cells were not significantly different over time between persistent-infection and controlled-infection statuses (Tables S1, S2, and S3). Interestingly, a significantly higher proportion of CD4^{lo}CD8^{hi} T cells infiltrating granuloma-like structures was found for the persistent-infection status than for the controlled-infection status (Fig. 10D).

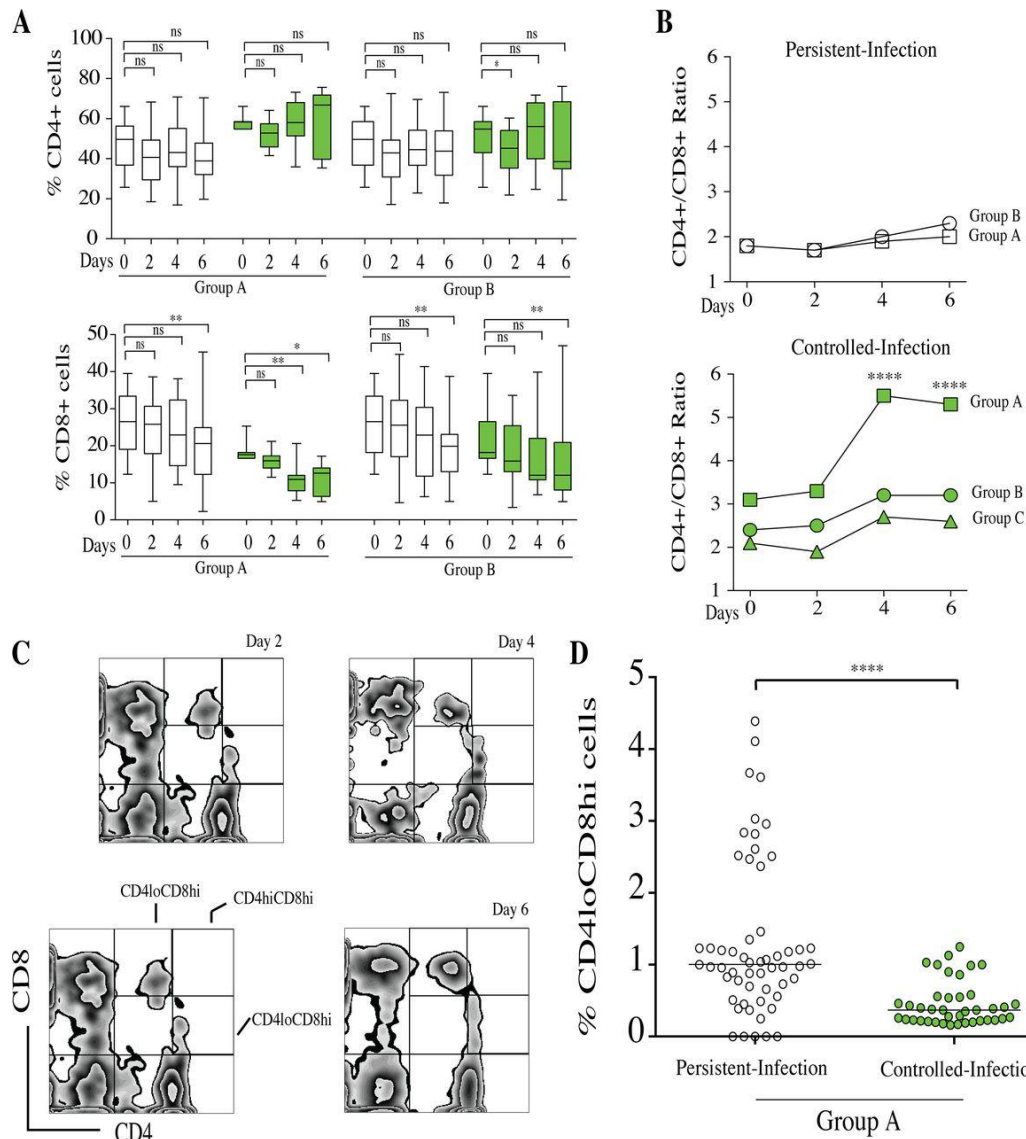


FIG 10 Characterization of CD4+ CD8+ doubly positive T cells within *Candida* granuloma-like structures from group A over time. (A) Proportions of CD4+ and CD8+ cells within granuloma-like structures are expressed as percentages of the total CD3+ compartment. Box plots depict median, minimum, and maximum percentages of CD4+ and CD8+ cells over time according to infection status (persistent [white boxes] and controlled [green boxes]) and *Candida* groups. (B) Dynamics of CD4+/CD8+ ratio over time between persistent-infection and controlled-infection granuloma-like structures. (C) Representative flow cytometry analysis showing CD4+ and CD8+ cells after gating on CD3+ lymphocytes. CD4loCD8hi, CD4hiCD8hi, and CD4hiCD8lo cells were analyzed in the upper right quadrant. (D) The proportions of CD4loCD8hi cells within granuloma-like structures are expressed as percentage of the total CD4+ CD8+ doubly positive T cell compartment. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.0001$; ****, $P < 0.00001$ (by one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparison test) (n = 120).

PMN depletion from granuloma-like structures is crucial for the persistent-infection status. To investigate the role played by polymorphonuclear leukocytes (PMN) during the first 2 days postinfection and the relationships with the dynamics of cellular interactions, the

granuloma-like structure assay was performed in their absence. PBMC were infected with *C. albicans* clinical isolates, and granuloma-like structure formation over the time was observed in all of subjects. The number and size of these structures were significantly higher when PMN were depleted on day 0 than those under PMN+ control conditions (Fig. 11A). The mean CFU per milliliter within granuloma-like structures was higher under PMN- conditions than under PMN+ control conditions. However, the dynamics of CFU per milliliter overlapped substantially between the two groups. As previously shown, two subjects were able to clear infection by all of the *C. albicans* clinical isolates (Fig. 11B).

For flow cytometry analyses, CD66+ and CD14+ cells and total lymphocytes were gated from the living cell compartment (regions I, II, and III, respectively). Results were indicated in percentages of cells from the total living cells (Fig. 11C). The mean percentages of CD66+, CD14+, and lymphocytes on day 0 of infections were, respectively, 7%, 16%, and 66%. Due to the significant depletion of CD66+ PMN cells on day 0 of infection, the proportions of CD14+ and total lymphocytes were significantly higher than under PMN+ control conditions. As previously shown under PMN+ conditions, the proportion of CD66+ cells was significantly higher after 2 days in granuloma-like structures in which infection was controlled (PMN+, CI) than under persistent-infection status (PI). Granuloma-like structures under PMN- conditions showed mean percentages of CD66+ cells less than 7% at 6 days postinfection (Fig. 11D).

Even if a higher proportion of CD14+ cells was present during the first 2 days of infection under PMN- conditions, the mean percentage of these cells was significantly decreased, by 56%, between days 4 and 6. These results fit with the dynamics of CD14+ cells in persistent-infection granuloma-like structures (Fig. 11E). The infiltrating total lymphocytes were significantly more abundant under PMN- conditions; the percentages varied between 66% and 71% over the duration (Fig. 11F). Similar to the case with persistent-infection outcomes, the dynamics of CD56+ cells under PMN- conditions was characterized by a lower reduction of this cell subset on days 4 and 6 than with controlled-infection outcomes (Fig. 11G). Despite the relative abundance of total lymphocytes, the ratio of CD4+ to CD8+ cells between days 4 and 6 was significantly lower than for the controlled-infection status (Fig. 11H).

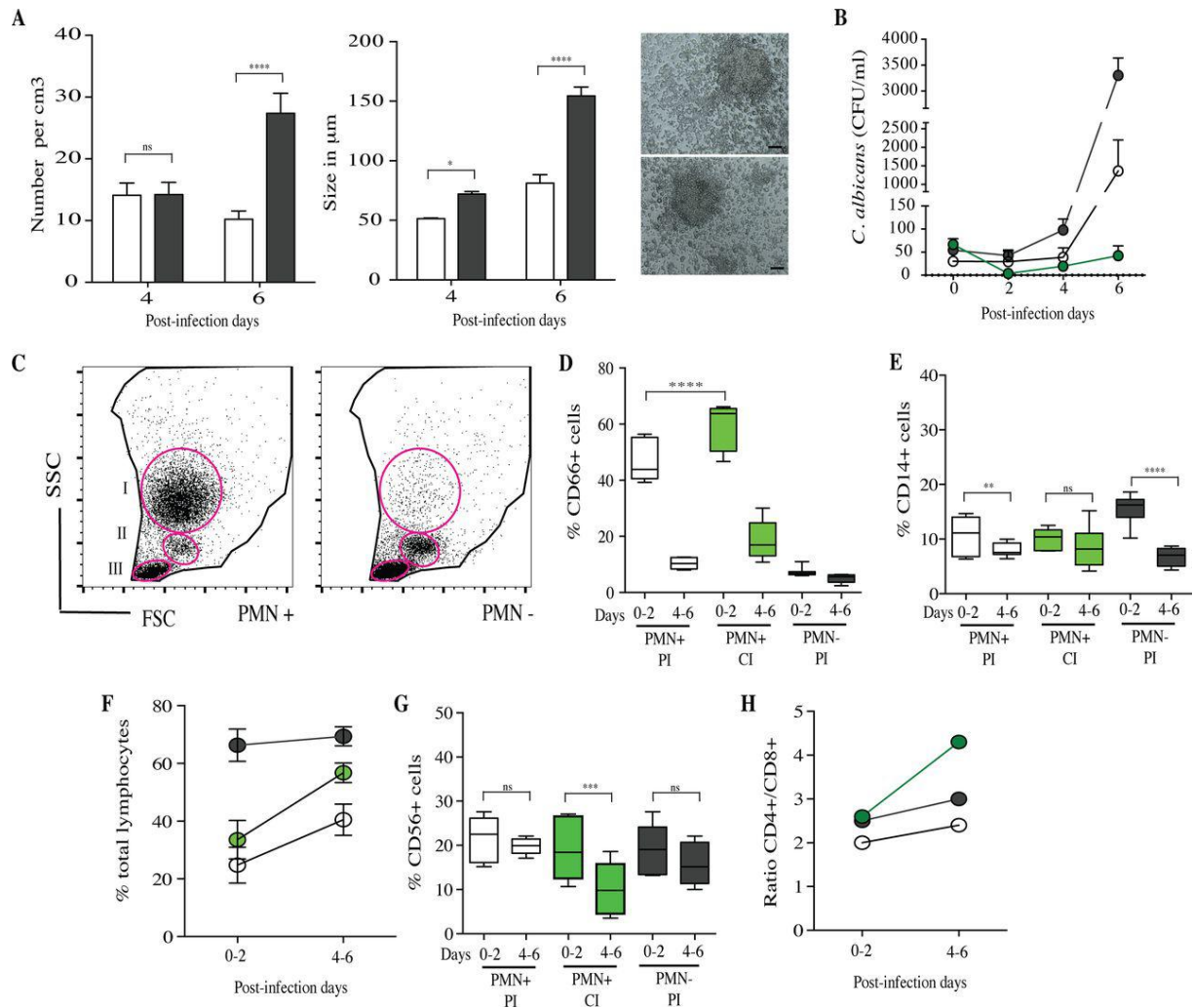


FIG 11 Characterization of PMN-depleted granuloma-like structures. (A) Number and size of granuloma-like structures on days 4 and 6 after infection by *C. albicans* species. Black bars, PMN-depleted conditions; white bars, nondepleted control conditions. Right images depict representative immune infiltrates observed under light microscopy 6 days after challenge under PMN-depleted conditions. (B) Dynamics of *C. albicans* CFU per milliliter over time. Shown are means \pm SEM of the fungal burdens of *C. albicans* clinical isolates in PMN-depleted granuloma-like structures showing a PI status (gray circles), in PMN+ granuloma-like structures showing a PI status (white circles), and in PMN+ granuloma-like structures showing a CI status (green circles). (C) Representative flow cytometry analysis showing SSC-versus-FSC plot of granulocyte (I), monocyte (II), and lymphocyte (III) selection under PMN-depleted (PMN-) and nondepleted control (PMN=) conditions. CD66+ cells were gated from region I; CD14+ monocytes were gated from region II. CD3- CD56+ , CD3+ CD4+ , and CD3+ CD8+ cells were gated from region III. (D and E) The proportions of CD66+ and CD14+ cells within granuloma-like structures are expressed as percentages of the total living cell compartment. Box plots depict median, minimum, and maximum percentages of cells in PMN+ PI, PMN+ CI, and PMN- PI. (F) Total lymphocyte proportions according to PMN+ PI (white circles), PMN+ CI (green circles), and PMN- PI (gray circles) statuses. (G) Proportions of CD56+ cells within granuloma-like structures over time in PMN+ PI, PMN+ CI, and PMN- PI outcomes. (H) Dynamics of CD4+/CD8+ ratio over time. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$; ***, $P < 0.0001$; ****, $P < 0.00001$ (by one-way ANOVA with Tukey's multiple-comparison test) ($n = 40$).

Discussion

The understanding of the complex relationships between human and *Candida* has known tremendous progress in the last decades (14, 41, 42). The efficiency of human innate and adaptive immunity in controlling *Candida* infections is underscored by the wide range of *Candida* species, by their pathogenic adaptations (morphological switch), by the diversity of clinical manifestations and by the variety of pathophysiological niches (43). The concept of a damage response framework (DRF) from the perspective of candidiasis clearly defined how much human infections are a result of *Candida*-mediated damage, human-mediated damage, or both (13). From this context, it is clear that fungal factors interact closely with multiple human immune cells at a local tissue level (31). However, when local immune responses are impaired, this usually leads to dissemination. In addition to *C. albicans*, which is the most common cause of bloodstream infections, other *Candida* species have become prevalent. While the short-time interaction of *C. albicans* with human immune cells has been well investigated, studies of other species need to be improved (44).

The goal of the present study was to examine, at a cellular scale, *Candida* spp. and human immune cells in a long-term interaction. After infection of human immune cells with clinically relevant *Candida* species, we found variations in the cellular composition and cytokine environment of immune infiltrates during the course of infection. To our knowledge, this is the first reported experiment showing that clinically relevant *Candida* species induced such immune infiltrates after a long-term interaction with human cells. These local immune responses could represent the main interface between the fungi and the host.

Thirty-two clinical isolates from eight clinically relevant *Candida* species were used to infect human peripheral mononuclear and polymorphonuclear immune cells from immunocompetent subjects. These species, primarily found in infected tissues, undergo a combination of yeast, hypha, and pseudohypha morphological switches. In this study, we have demonstrated that interaction of *Candida* spp. and human immune cells from subjects without any apparent immunodeficiency is dependent on the fungal species and the immune cells with which they interact. Morphometric and histological analyses highlighted for the first time that immune infiltrates are induced by *Candida* spp. and that they shared a cellular composition similar to granuloma-like structures. Due to the broad variability of granuloma reactions induced against infectious diseases, their classification remains complex. Some granuloma structures are composed by activated macrophages surrounding a necrotic region with a ring of T and B lymphocytes. Other types of granulomas include nonnecrotizing granulomas (which activated epithelioid macrophages with some lymphocytes), necrotic

neutrophilic granulomas, and completely fibrotic granulomas. Our data are in line with the histological description of nonnecrotizing granulomas formed during bacterial infections, such as during *M. tuberculosis* infection (37, 39, 45). Moreover, the technical manipulation and isolation of these complex structures were similar to those implemented for mycobacterial *in vitro* granulomas. Similar models have been useful to investigate and recapitulate other mycobacterial, protozoan, helminthic, and fungal pathophysiologies, for which granuloma formation is a hallmark of pathology (38, 46–52). In a previous work, we have validated an *in vitro* multicellular interaction model with *C. albicans* (40).

Considering that the granulomatous inflammatory reaction during invasive candidiasis is rarely described (24–27), few studies have addressed the question of long-term local immune responses. Our experimental data suggest that multicellular immune infiltrates are formed after *Candida* infection, sharing characteristics of a granuloma-like reaction. These reactions deserve more investigation, since they are important interfaces between the host and *Candida*. Moreover, the accurate relationship between granuloma-like dynamics and chronic candidiasis pathophysiology needs further studies. Microabscesses that are usually observed during disseminated *Candida* infections are scattered foci of necrosis surrounded by polymorphonuclear leukocytes, macrophages, and epithelioid cells. In light of our observations, it is not clear, however, how these structures could be the consequence of late immune infiltrates. Furthermore, the translational relevance of this granulomatous reaction is in agreement with murine models of hematogenously disseminated candidiasis in which infection occurs in hosts with weak or normal immune responses (29, 30).

We observed that fungal growth was controlled during the first 2 days after infection in the same way for all the *Candida* clinical isolates. However, substantial differences were found between species in terms of their resulting fungal proliferation 6 days after challenge. Three different groups of *Candida* species were identified, by taking into account fungal proliferation and host cellular response characteristics (number and size of induced granuloma-like structures, the resulting fungal burden, and the growth rates 6 days after challenge). Group A (*C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. tropicalis*) was characterized by high proliferation rates from day 4 to day 6. *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, and *C. glabrata* (group B) also formed granuloma-like structures, but their proliferation rates were lower than for group A. Group C comprised *C. krusei* and *C. kefyr*, which showed longer generation times than the other species and were progressively cleared from granuloma-like structures over time. These observations are consistent with phylogenetic studies showing that *C. albicans*, *C. dubliniensis*, and *C. tropicalis* are closely related and form hyphae and pseudohyphae (53).

Moreover, the ability of *Candida* species to form hyphae constituted a virulence factor. In addition, *C. lusitaniae* and *C. parapsilosis*, which are found in infected tissues as a combination of pseudohyphae and yeasts, have a lower virulence and rarely or never form hyphae. Based on the dynamics of the fungal burden, two infection outcomes were identified: a controlled-infection (CI) status comprised the granuloma-like structures from subjects with a fungal burden lower than 100 CFU/ml on day 6 postinfection, while the persistent-infection (PI) status comprised granuloma-like structures from subjects whose fungal burden was higher than 100 CFU/ml.

In the second part of this study, the dynamics of cellular interactions between controlled-infection and persistent-infection statuses were compared. As the role of phagocytic cells in *Candida* infection has been clearly demonstrated, the analyses began by taking into account the dynamics of these cells in these human-like environments. *Candida* species are actively recognized by monocytes/macrophages (5). Neutrophils are also essential for the early clearance of *Candida* yeasts and hyphae (54). These cell types are crucial in the innate response against systemic *C. albicans* infections, underscored by the fact that prolonged neutropenia and macrophage disruption are risk factors of invasive candidiasis (55). Our results confirmed the essential role of phagocyte cells during the first steps and the outcome of infection. Hence, significantly higher percentages of CD66+ neutrophils were found on day 0 when infection was controlled. Then, in both controlled and persistent infections, CD66+ cell percentages drastically decreased between day 0 and day 6 after challenge. These results could be due to the natural death of neutrophils under our experimental conditions or to their destruction after killing of *Candida* yeasts and hyphae by breaking down and releasing their nuclear content as neutrophil extracellular traps (NETs) (56–58). Therefore, 2 days after challenge, CD66+ neutrophils still remained high within granuloma-like structures for the controlled-infection status. Studies involving neutrophils are challenging considering their half-life in the circulation of approximately 6 h. However, recent studies have demonstrated that during inflammation, neutrophils become activated and their longevity is increased in order to prime immune responses (59, 60).

The CD14+ proportions did not differ between controlled and persistent infections at the time of challenge. However, in granuloma-like structures in which infection was controlled, CD14+ macrophages remained abundant over 4 days after infection, whereas they were reduced when infection persisted. Previous work with *Histoplasma capsulatum* granuloma-like structures also provided evidence that the proportion of macrophages decreases at later time points (52). Studies addressing the role of phagocytes in fungal infections have shown

that the killing of macrophages by *Candida* spp. is an evading mechanism by which the fungus can replicate in phagocytes and then disseminate (61). Overall, it is clear from our results that higher proportions of CD66+ neutrophils at the beginning of infection and a better resistance of macrophages to killing by *Candida* over 4 days after infection are significantly related to controlled-infection outcomes. This argument could be supported by the fact that monocytes can increase neutrophil phagocytic recruitment and may play a crucial role in controlling disseminated fungal infection (62).

In accord with the classic cytotoxic functions of NK cells, which respond to invading pathogens by recognizing infected phagocytes and inducing direct cell death (63), our findings seem to indicate that such NK cell properties act at the early stages of infection and are progressively cleared in controlled-infection granuloma-like structures. A recent study showed that *C. albicans* established contact with human NK cells before engaging in interactions resembling phagocytosis (17). Moreover, these results are supported by other studies showing that the depletion of NK cells in immunocompetent mice does not adversely affect survival after infection with *C. albicans* (18). Additionally, human NK cells exert anti-*Candida* direct effector functions or act indirectly by priming neutrophil candidacidal activity (17).

Neutrophils present antigens for T cell activation, leading to the recruitment of CD4+ T cells that support the generation of an optimal CD8+ T cell population (64). Previous studies have shown that CD4+ T cells in mice are significantly produced after stimulation with *Candida* antigens (65). It has been proposed that specific protection against a variety of mycoses corresponds to the activation of CD4+ T cells (66). Other studies have suggested a role for CD8+ T cells in the elimination of *C. albicans* from liver and gastrointestinal mucosa (67). Growth of *C. albicans* hyphae could also be inhibited by activated CD8+ T cells (68). The relative contribution of CD4+ T cells to the recruitment of CD8+ T cells is supported by clinical studies showing a particularly high incidence of oropharyngeal candidiasis in HIV patients with low CD4+ T cells (69, 70). Our results suggested that CD4+ and CD8+ T lymphocytes were significantly recruited into granuloma-like structures. Whereas the CD4+ T cell percentage fluctuated over time, the CD8+ T cell percentage progressively decreased. Similarly to the case with other studies of disseminated candidiasis, the percentages of CD4+ T cells were higher than those of CD8+ T cells at all time points tested (71, 72).

Interestingly, the results obtained in this study also highlighted that the CD4+/CD8+ ratio was higher in controlled-infection than in persistent-infection granuloma-like structures. This difference was attributable to a decrease in CD8+ T cell proportions. From these analyses,

both T cells and CD56⁺ NK cells could contribute to the IFN- γ milieu that we observed during the earlier stages of granuloma-like structure formation in the controlled-infection status.

To our knowledge, this study provides, for the first time, evidence that CD4⁺ CD8⁺ doubly positive (DP) T cells infiltrate human granuloma-like structures of *Candida* spp. during the late stages after challenge. However, the functions and phenotypic characteristics of this specific T cell subset during candidiasis are still unknown. Total CD4⁺CD8⁺ lymphocytes have previously been observed during vaginal inoculation of *C. albicans* into estrogen-conditioned mice (73). Another study observed that mouse immunization with mannan–human serum albumin conjugates from *C. dubliniensis* induced a significant increase of CD4⁺ CD8⁺ T cells (74). Previous studies reported that CD4^{lo}CD8^{hi} T cells increase in patients with chronic viral infections, autoimmune diseases, and cancer (75). Taken together, our results showed specific signatures in the fluctuation of CD4/CD8 cell ratios between *Candida* species. Proportions of CD4^{lo}CD8^{hi} T cells were significantly higher in granuloma-like structures for the persistent-infection status than in those for the controlled-infection status when cells were infected by *C. albicans*, *C. dubliniensis*, and *C. tropicalis*.

Taken together, our data indicated that *Candida* granuloma-like structures lead to a controlled- or persistent-infection status. High proportions of CD66⁺ neutrophils at the beginning of challenge characterized a controlled-infection status. Moreover, CD56⁺ NK cells and the elevated CD4⁺/CD8⁺ T cell ratio were correlated with early production of IFN- γ . Additionally, local IFN- γ could activate CD14⁺ macrophages to produce reactive radicals essential for *Candida* eradication. The early production of cytokines such as IFN- γ was also observed in correlation with *C. albicans* clearance from the oral mucosa of BALB/c mice (76). Moreover, variations in cytokine production resulted in a persistent phenotype. In the persistent-infection status, cytokine production was delayed and was composed of a high ratio of proinflammatory versus anti-inflammatory cytokines, such as IL-6, IFN- γ , TNF- α , and IL-10. Under our conditions, the production of IFN- γ was suboptimal and delayed, suggesting an inability of the host to eliminate the infection. This correlates with the delayed and lower production of cytokines in mouse models susceptible to candidiasis (76). As we compare our study to other *in vitro* studies, the detection of low cytokine concentrations under our culture conditions could be explained by methodological differences such as the antigenic stimulation, immune cell concentrations, and cytokine turnover (77). Nevertheless, PMN depletion studies indicated that PMN not only are major effectors of during acute *Candida*

infection but also could be a determinant during chronic inflammatory conditions and adaptive responses against this fungal pathogen. By defining the precise cellular orchestration during *Candida* infections, it would be possible to manipulate these responses in the infection site to enhance their effector functions. These granuloma-like structures seem to be relevant for the pathophysiology of candidiasis and could enable the exploration of novel antifungal strategies.

Materials and Methods

Preparation of *Candida* blastoconidium suspensions. Eight *Candida* species (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei*, and *C. kefyr*) were tested for the ability to induce immune infiltrates. Four clinical isolates from each species were analyzed. The 32 *Candida* clinical isolates were obtained from the MycoBank of the Parasitology and Medical Mycology Department, Nantes, France. Clinical isolates were sown on potato dextrose agar (PDA) and incubated overnight at 30°C. For *in vitro* granuloma-like structure experiments, yeast cells were counted and suspended at different concentrations in RPMI 1640 (Sigma) supplemented with 8% human serum (HS).

***Candida* and human leukocyte cocultures.** Blood samples were obtained from 10 healthy subjects by venipuncture at the Etablissement Français du Sang, Pays de la Loire, France. Blood was processed within 2 h of collection. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and polymorphonuclear leukocytes (PMN) were subsequently separated by dextran sedimentation (dextran 500, 8% [wt/vol]; density, 1.113 ± 0.001 g/ml), followed by gradient centrifugation (dextran/blood ratio of 1:1). Plasma was removed and the first higher band of PBMC was separated and suspended in RPMI 1640–8% HS. The remaining lower band of PMN (>98%) was removed and suspended in the same medium. Cell suspensions were washed twice in RPMI 1640–8% HS by centrifugation. Fresh cell fractions were enumerated by cell counting and pooled following their basal proportions. The ratio of PMN over monocytes varied between 10:1 and 8:1 depending on each subject count. The range of monocyte percentages of 10 donors varied between 4% and 12%. The range of PMN percentages was between 45% and 65%. Total leukocytes (pooled PMN and PBMC) were adjusted to a final concentration of 2.5 × 10⁶ cells/ml and cultured in RPMI 1640 – 8% HS in 24-well tissue culture plates (around 2.0 × 10⁵ cells were monocytes). Freshly isolated cells were immediately infected with 32 *Candida* clinical isolates from eight species at a

monocyte/blastoconidium ratio of 2,000:1. Cells were incubated à 37°C and 5% CO₂. Uninfected leukocytes were used as a negative control of cellular aggregation. The fungal burden within compact immune infiltrates was determined by CFU calculation, and human immune cell composition over time was analyzed by flow cytometry on days 0, 2, 4, and 6 postinfection. The total number and viability of cells at each time point were assessed by cell counting in the presence of 0.5% eosin. Immune infiltrates were counted under light microscopy (x50) at 4 and 6 days postinfection. Their sizes in micrometers were also determined.

PMN depletion from *Candida* and immune cell cocultures. We assessed the effect of PMN exclusion at day 0 of infection on the dynamics of immune infiltrate formation and cell composition over the time. Differential counts on the mononuclear cell population showed between 1 to 7% granulocytes after separation. After washing twice in RPMI 1640 – 8% HS, PBMC were adjusted to a final concentration of 2.5×10^6 cells/ml and cultured in RPMI 1640–8% HS. Fresh preparations were infected with *C. albicans* clinical isolates from at a monocyte/blastoconidium ratio of 2,000:1. PMN-depleted immune infiltrates were analyzed as described above and compared to those under PMN+ conditions. The ratio of PMN to monocytes for these control conditions was 8:1.

CFU assay. The *Candida* growth (CFU) was measured by counting the living yeasts with a colony-counting technique at different time points (0, 2, 4, and 6 days postinfection). After elimination of the supernatant, cells were washed twice in RPMI 1640–8% HS and cell layers were gently scraped. Cell suspensions were homogenized by pipetting, and several dilutions of each well (two wells per point) were plated on PDA plates. After incubation for 24 to 48 h à 30°C, *Candida* colonies were counted. Data were expressed in CFU per milliliter and corresponded to the fungal burden of both yeasts within the granuloma-like structures and, for filamentous species, hypha formation.

Growth test. Growth rates of 32 *Candida* isolates were tested under the same culture conditions as used for the study of granuloma-like structures (RPMI 1640 plus 8% HS, 37°C, and 5% CO₂). One culture plate was used for each clinical isolate, and fungal multiplication was followed by assessing living yeasts in CFU at 24 h, 48 h, 3 days, 4 days, and 6 days. The maximum growth rate (μ_{\max}) and the generation time were calculated.

Histological analyses. Immune infiltrates were collected on days 4 and 6 after infection. After elimination of the supernatant, cell layers were washed twice in phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS). Remaining compact immune-associated cells were gently scraped without dispersion in PBS–2% FBS and plated on glass

slides by centrifugation at 500 rpm in a Cytospin centrifuge (Cytobuckets S; Jouan). Slides were stained with May-Grünwald-Giemsa staining, and fungal and immune cells associated with immune infiltrates were analyzed by light microscopic identification.

Video imaging. For coculture analyses by video imaging, PBMC were infected with CAI4 *C. albicans* cells containing the pACT1-GFP fusion protein. Ten-milligram quantities of pACT1-GFP and pGFP fluorescence negative-control plasmids were linearized by digestion with BglII and used to transform *C. albicans* by electroporation. Single-copy integrants at the RPS10 locus were selected as previously described by Barelle *et al.* (78). Single colony transformants from minimal SD (single dextrose) medium containing 2% glucose were inoculated into 1 ml of synthetic complete medium containing Casamino Acids in order to induce ACT1-GFP expression. The cells were incubated for 2 h at 30°C to reach maximum fluorescence, collected by centrifugation at 3,000 x g for 10 min, analyzed to find the expression level under fluorescence microscopy (Leica Microsystems, Nanterre, France), and then used to infect human PBMC at a multiplicity of infection (MOI) of 200:1. This MOI was chosen in order to increase the probability of finding and recording the formation of immune infiltrates. The cells were illuminated at day 0 and every 10 min over 72 h of incubation with a 300-W xenon lamp equipped with a 488-nm excitation filter. Emission at 515 nm was used to analyze *C. albicans* fluorescence with a Leica DMI6000B CoolSnap HQ2 camera (Roper, Tucson, AZ) and processed with Metamorph imaging software version 7.7.4.0 (Universal Imaging, Downington, PA).

Confocal microscopy. Human immune cells were incubated with GFP-tagged *C. albicans* under the same coculture conditions as described above. Cells were incubated in Lab-Tek slides for 6 days at 37°C and 5% CO₂. After being washed twice in PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 30 min, cells were permeabilized with 100% acetone. Nonspecific binding sites were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in PBS for 30 min. Rhodamine-conjugated phalloidin (Wako; Osaka, Japan) was added at a 1:600 dilution to stain actin filaments for 30 min at room temperature. Nuclear DNA was stained with Hoechst in PBS for 1 min. Slides were air dried and mounted with Vectashield medium. Fluorescence-stained sections were examined under a Nikon A1 RSI microscope with a magnification of x20 at constant Z-steps of 1 µm. The laser confocal system comprised a 65-mW multi-Ar laser. Three-dimensional (3D) images were processed with NIS elements version 3.21 (Nikon Instruments Inc.) and Volocity 3D image analysis software version 6.01 (PerkinElmer).

Flow cytometry. After elimination of the cell culture supernatant, granuloma-like structures were washed twice in PBS at 37°C in order to eliminate nonadherent cells and keep only

granuloma-like structures. The total number and viability of cells at each time point were assessed by cell counting in the presence of 0.5% eosin. Granuloma-like structures from two well plates per condition were gently scraped, pooled, and dispersed by pipetting. After single living cell gating, the mean percentages of viable cells varied between 75 and 95% for all donor samples. The same was done with 2 control wells for each day tested (2, 4, and 6 days). The cells were suspended in 250 μ l of PBS–1% BSA and stained with a cocktail of fluorescence-conjugated antibodies in PBS–1% BSA. The antibodies were specific to CD3-VioBlue (clone BW264/56; MACS Miltenyi Biotec), CD4-fluorescein isothiocyanate (FITC) (clone VIT4; MACS Miltenyi Biotec), CD8-phycoerythrin (PE) (clone BW135/80; MACS Miltenyi Biotec), CD56- allophycocyanin (APC) (clone AF12-7H3; MACS Miltenyi Biotec), CD14-APC-Vio770 (clone TU⁺ k4; MACS Miltenyi Biotec), and CD66abce-PE-Vio770 (clone TET2; MACS Miltenyi Biotec). Stain specificity was verified with isotype-matched control antibodies FITC-conjugated mouse IgG1, VioBlue-conjugated mouse IgG1, APC-conjugated mouse IgG1, and PE-conjugated mouse IgG2. Cells were incubated for 1 h at 4°C in the dark, washed twice with PBS, and analyzed by flow cytometry. After gating on CD3 lymphocytes, the CD3⁺ population was separated into CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Natural killer cells were gated out from the CD3⁻ population. CD66⁺ neutrophils and CD14⁺ monocytes came from granulocyte and monocyte regions. All data were acquired using a FACSCanto II instrument (BD Biosciences) and analyzed with FlowJO software version 9.4.10 (Tree Star Inc.) and DIVA software version 6.2 (BD Biosciences) to separate the different cell subsets constituting granuloma-like structures.

Cytokine assay. One milliliter of supernatant was removed for each clinical isolate and for the control at 2, 4, and 6 days postinfection. Samples were conserved at -80°C. Different cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F, and IL-22) were quantified with a ProcartaPlex multiplex immunoassay kit (Affymetrix; eBioscience) on a MAGPIX system (Luminex) according to the manufacturer's instructions. One multiplex suspension bead array immunoassay enabled the simultaneous measurement of cytokine supernatant levels (according to the standard protocol). Standard curves of each analyte were generated using the reference analyte concentration supplied by the manufacturer. Each sample was measured twice. Cytokine concentrations were calculated using ProcartaPlex Analyst 1.0 software (Affymetrix; eBioscience).

Statistical analyses. Statistical analyses were all carried out with Prism V6.0a software (GraphPad Software). The fungal burdens 6 days after challenge with each *Candida* species were compared using a two-way ANOVA test with Tukey's correction for multiple

comparisons. The fold increase of fungal burdens and the growth rates were calculated in percentages and added to the multiple-comparison analyses. The size and number of induced granuloma-like structures were also compared between species with a one-way ANOVA with Tukey's correction for multiple comparisons. The D'Agostino & Pearson Omnibus normality test was performed on all data. Whether data were normally distributed or not, parametric *t* tests and two-way ANOVA were used when comparing two or more groups. For correlation, nonparametric Spearman's ρ was calculated. P values of 0.05 were considered significant.

Ethics statement. All studies were approved by the local ethics committee Comité de Protection des Personnes Ouest IV-Nantes and the Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé. Written consent was obtained from all patients and healthy subjects.

Acknowledgments

We are grateful to Francine Jotereau and Frédéric Altare from the INSERM UMR 892, CRCNA, Nantes, France, for their outstanding technical assistance and valuable suggestions about CD4+ CD8+ T lymphocytes. We thank Erwan Mortier from the INSERM UMR 892, CRCNA, for valuable suggestions and reading the manuscript. We also thank the healthy donors included in this study. We also thank Philippe Hulin and the PICell platform (IFR26, Nantes, France) for providing expert technical assistance in video microscopy. We thank the Cytometry Facility Cytocell for expert technical assistance.

Supplemental material

Supplemental material for this article may be found at <https://doi.org/10.1128/IAI.00807-16>.

VIDEO S1, MOV file, 5.1 MB.

VIDEO S2, MOV file, 9.9 MB.

Supplemental material

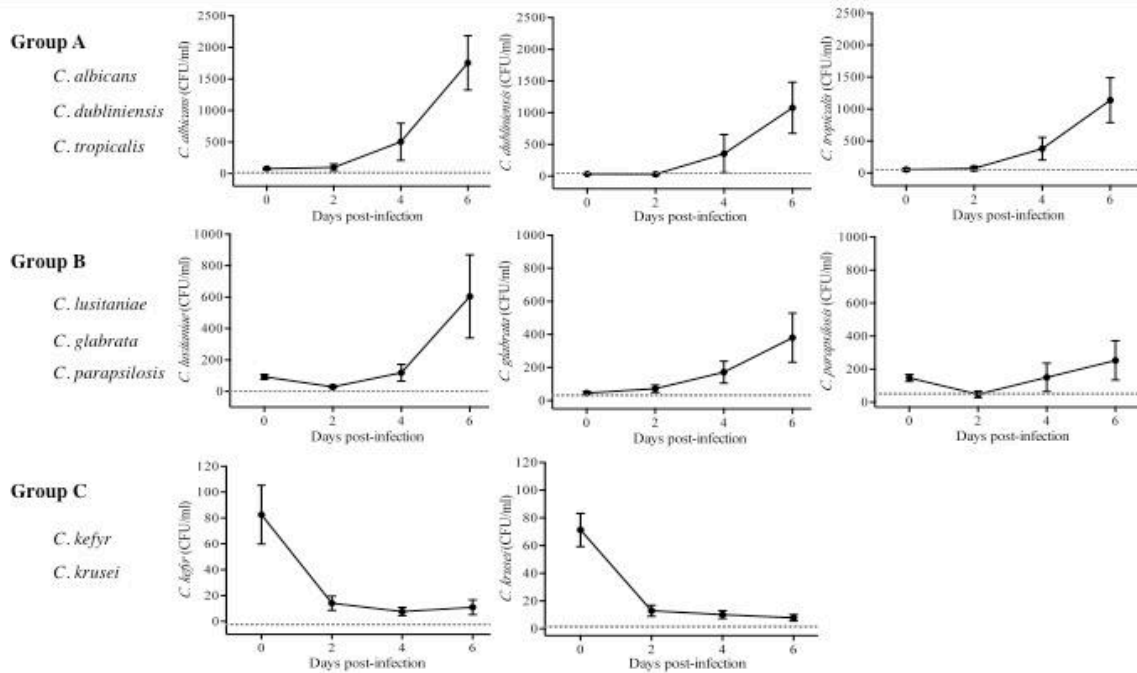


Fig. S1. Evolution profiles of the fungal burden within granulomatous structures of *Candida* spp. The fungal burden was followed at 0, 2, 4 and 6 days after infection of human peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells with living yeasts from different *Candida* species. Results are expressed as colony-forming units per ml (CFU/ml). Data are represented as the mean \pm SEM of the fungal burden from ten healthy donors for each *Candida* species. Profiling was performed according to the two-way ANOVA statistical analysis ($\alpha = 0.05$). Three profiles were identified: profile A: *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. tropicalis* showing “high” fungal burdens. Profile B: *C. lusitanae*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* showing “intermediate” fungal burdens. Profile C: *C. kefyr* and *C. krusei* presenting “low” fungal burdens.

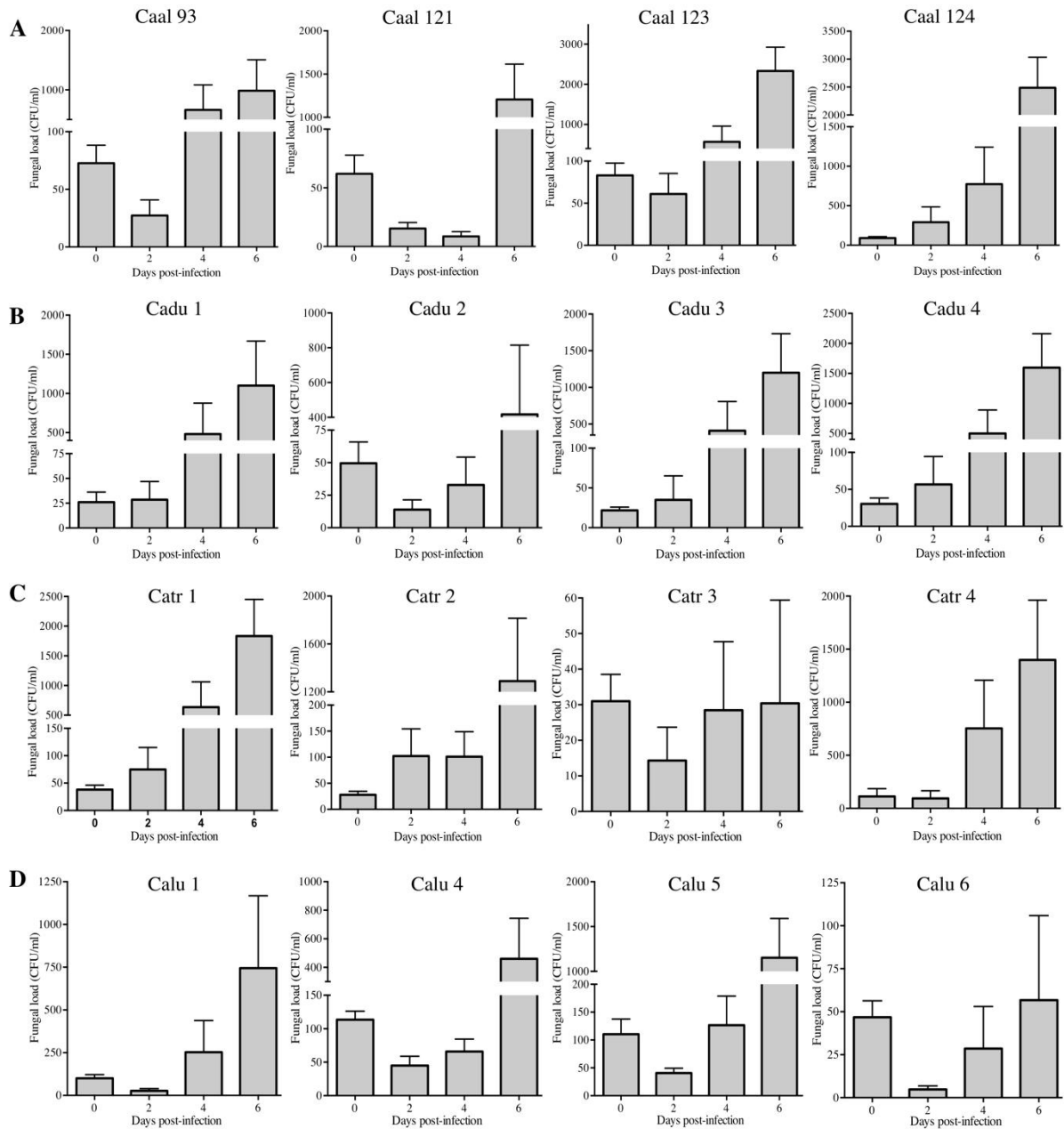


Fig. S2. Evolution of the fungal burden within granulomatous structures of 32 clinical isolates of *Candida* spp. The fungal burden was followed at 0, 2, 4 and 6 days after infection of human peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells with living yeasts from different *Candida* species. Results are expressed as colony-forming units per ml (CFU/ml). Data are represented as the mean \pm SEM of the fungal burden from ten healthy donors for each *Candida* species: (A) *C. albicans*, (C) *C. dubliniensis*, (C) *C. tropicalis* and (D) *C. lusitaniae*.

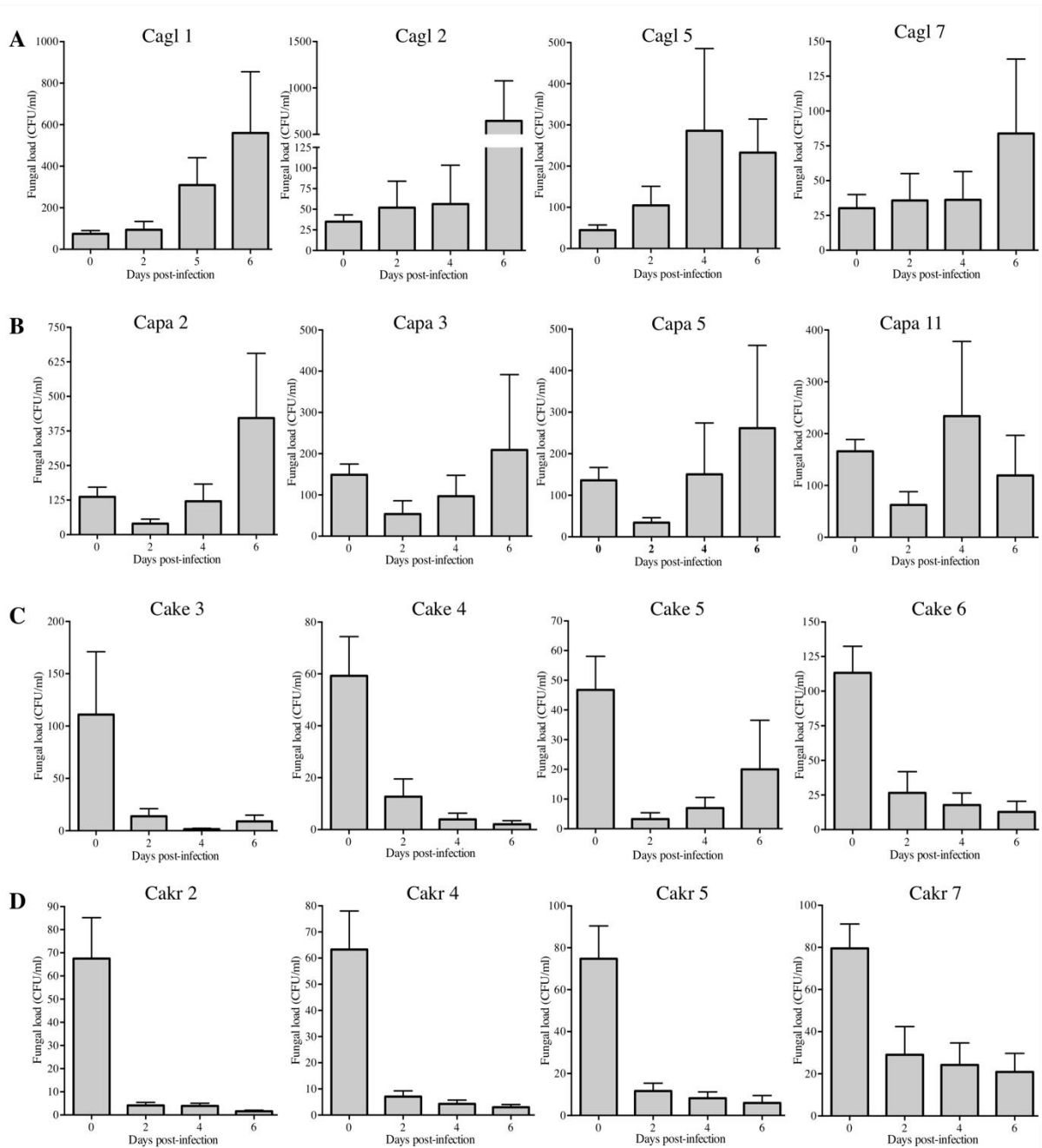


Fig. S3. Evolution of the fungal burden within granulomatous structures of 32 clinical isolates of *Candida* spp. The fungal burden was followed at 0, 2, 4 and 6 days after infection of human peripheral blood mononuclear and polymorphonuclear cells with living yeasts from different *Candida* species. Results are expressed as colony-forming units per ml (CFU/ml). Data are represented as the mean \pm SEM of fungal burden from ten healthy donors for each *Candida* species: **(A)** *C. glabrata*, **(B)** *C. parapsilosis*, **(C)** *C. kefyr* and **(D)** *C. krusei*.

Table S1. Distribution of granulocyte, monocyte and T cell subsets based on CD66, CD14, CD56, CD4 and CD8 from persistent-infection and controlled-infection granulomas after infection with *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. tropicalis* (group A).

	Day 0				Day 2				Day 4				Day 6			
	Mean (SD) PI	Mean (SD) CI	<i>p</i>	Mean Diff.	Mean (SD) PI	Mean (SD) CI	<i>p</i>	Mean Diff.	Mean (SD) PI	Mean (SD) CI	<i>p</i>	Mean Diff.	Mean (SD) PI	Mean (SD) CI	<i>p</i>	Mean Diff.
CD66+	40.24 (9.95)	60.33 (13.96)	****	-20.1	26.26 (18.64)	46.78 (13.31)	****	-20.5	14.57 (6.32)	15.95 (5.206)	ns	-1.3	7.15 (7.77)	12.22 (6.41)	ns	-5.1
CD14+	6.31 (2.35)	5.94 (0.936)	ns	0.4	5.43 (3.767)	7.133 (1.94)	ns	-1.7	4.60 (4.51)	6.14 (3.11)	ns	-2	1.16 (1.41)	3.52 (2.55)	*	-2.4
CD3-CD56+	14.26 (4.93)	12.13 (4.864)	ns	2.2	15.2 (6.82)	12.96 (5.12)	ns	2.3	11.5 (4.952)	8.30 (3.969)	ns	3.2	13.55 (8.40)	4.81 (3.033)	****	8.7
CD3+CD56+	5.56 (6.13)	4.28 (1.27)	ns	1.2	4.01 (3.30)	2.923 (0.92)	ns	1.1	4.45 (4.44)	2.48 (1.348)	ns	2	4.53 (5.43)	2.36 (1.10)	ns	2.2
CD3+	60.49 (9.42)	68.53 (3.435)	ns	3.1	50.37 (16.17)	59.70 (7.75)	*	-9.1	61.55 (13.36)	63.51 (12.71)	ns	-1.9	50.92 (12.29)	65.88 (17.77)	****	-15
CD4+CD8-	45.85 (11.67)	58.85 (3.993)	****	-13	40.07 (11.96)	51.78 (6.931)	***	-11.7	45.65 (14.76)	58.31 (10.78)	****	-12.7	41.46 (12.16)	59.76 (15.08)	****	-18.3
CD4-CD8+	26.19 (8.76)	18.96 (3.263)	ns	4.8	23.83 (8.84)	15.67 (2.412)	***	8.1	23.46 (9.395)	10.59 (3.33)	****	12.9	20.15 (9.844)	11.29 (3.68)1	****	8.9
CD4+:CD8+ ratio	1.75	3.1			1.68	3.3			1.94	5.51			2.06	5.29		
CD4hiCD8hi	0.20 (0.17)	0.22 (0.04)	ns	0	0.33 (0.43)	0.15 (0.12)	ns	0.2	0.36 (0.50)	0.15 (0.11)	*	0.4	0.13 (0.17)	0.07 (0.06)	ns	0.1
CD4hiCD8lo	0.57 (0.55)	0.55 (0.30)	ns	0	0.47 (0.6434)	0.38 (0.30)	ns	0.1	0.59 (0.85)	0.35 (0.23)	ns	0.2	0.67 (0.80)	0.37 (0.36)	ns	0.3
CD4loCD8hi	0.93 (0.76)	0.47 (0.22)	ns	0.5	0.73 (0.89)	0.31 (0.18)	ns	0.4	1.02 (1.441)	0.23 (0.15)	**	0.8	1.32 (1.079)	0.46 (0.31)	***	0.9

Results were expressed as the median fraction of cells expressing the marker(s) +/- SD among specific gates. Significant differences were evaluated by comparison between persistent-infection (PI) and controlled-infection (CI) status over time using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0001$; ****, $p < 0.00001$, ns: not significant.

Table S2. Distribution of granulocyte, monocyte and T cell subsets based on CD66, CD14, CD56, CD4 and CD8 from persistent-infection and controlled-infection granulomas after infection with *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* and *C. glabrata* (group B).

	Day 0				Day 2				Day 4				Day 6			
	Mean (SD) PI	Mean (SD) CI	<i>p</i>	Mean Diff.	Mean (SD) PI	Mean (SD) CI	<i>p</i>	Mean Diff.	Mean (SD) PI	Mean (SD) CI	<i>p</i>	Mean Diff.	Mean (SD) PI	Mean (SD) CI	<i>p</i>	Mean Diff.
CD66+	41.25 (12.93)	53.87 (14.91)	****	-12.6	31.33 (18.40)	42.06 (16.82)	****	-22.5	15.96 (4.730)	16.67 (4.73)	ns	-0.7	6.73 (6.82)	9.48 (7.70)	ns	-2.7
CD14+	6.11 (2.075)	6.579 (1.054)	ns	-0.3	6.10 (3.70)	6.48 (3.22)	ns	-1.8	3.88 (2.77)	5.71 (3.76)	ns	-1.1	2.70 (2.61)	2.53 (2.81)	ns	-0.1
CD3-CD56+	13.98 (4.79)	13.12 (5.19)	ns	0.8	15.32 (6.80)	13.37 (6.50)	ns	10.5	13.32 (6.03)	9.11 (4.42)	**	4.2	9.86 (5.404)	5.95 (3.53)	*	3.9
CD3+CD56+	5.91 (5.733)	4.618 (4.402)	ns	1.2	4.35 (3.317)	3.03 (2.33)	ns	1.3	4.14 (3.88)	3.50 (3.01)	ns	0.6	4.27 (4.98)	3.38 (4.67)	ns	0.8
CD3+	62.31 (10.05)	64.03 (7.316)	ns	-1.7	52.68 (13.42)	52.32 (13.01)	ns	0.3	59.47 (11.41)	65.06 (11.33)	ns	-5.5	53.30 (13.61)	56.87 (17.85)	ns	-3.5
CD4+CD8-	48.30 (12.44)	52.06 (10.36)	ns	-3.7	41.24 (12.71)	43.66 (10.93)	ns	-2.4	46.34 (13.71)	53.64 (14.49)	ns	-7.3	43.31 (14.01)	47.93 (18.15)	ns	-4.6
CD4-CD8+	26.21 (8.43)	21.35 (7.107)	ns	4.8	24.75 (9.74)	17.84 (8.23)	**	6.9	22.19 (10.52)	16.65 (8.96)	ns	5.6	19.15 (8.60)	14.83 (9.287)	ns	4.3
CD4+:CD8+ ratio	1.84	2.44			1.67	2.45			2.08	3.22			2.26	3.23		
CD4hiCD8hi	0.20 (0.13)	0.23 (0.16)	ns	0	0.28 (0.36)	0.26 (0.43)	ns	0	0.28 (0.34)	0.33 (0.45)	ns	-0.1	0.11 (0.12)	0.11 (0.13)	ns	0
CD4hiCD8lo	0.44 (0.32)	0.52 (0.36)	ns	-0.1	0.32 (0.29)	0.39 (0.35)	ns	-0.1	0.36 (0.29)	0.40 (0.32)	ns	0	0.45 (0.36)	0.43 (0.45)	ns	0
CD4loCD8hi	0.70(0.58)	0.88 (0.78)	ns	-0.2	0.62 (0.75)	0.66 (0.10)	ns	0	0.72 (0.91)	0.83 (1.31)	ns	-0.1	0.94 (0.82)	0.10 (1.14)	ns	0

Results were expressed as the median fraction of cells expressing the marker(s) +/- SD among specific gates. Significant differences were evaluated by comparison between persistent-infection (PI) and controlled-infection (CI) status over time using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0001$; ****, $p < 0.00001$, ns: not significant.

Table S3. Distribution of granulocyte, monocyte and T cell subsets based on CD66, CD14, CD56, CD4 and CD8 from persistent-infection and controlled-infection granulomas after infection with *C. krusei* and *C. kefyi* (group C).

	Day 0			Day 2			Day 4			Day 6		
	Mean (SD) CI	<i>p</i> vs. group A CI	<i>p</i> vs. group B CI	Mean (SD) IC	<i>p</i> vs. group A CI	<i>p</i> vs. group B CI	Mean (SD) CI	<i>p</i> vs. group A CI	<i>p</i> vs. group B CI	Mean (SD) CI	<i>p</i> vs. group A CI	<i>p</i> vs. group B CI
CD66+	48.61 (15.42)	***	ns	36.35 (18.29)	**	ns	16.13 (5.17)	ns	ns	8.50 (7.41)	ns	ns
CD14+	5.9 (2.172)	ns	ns	6.50 (3.41)	ns	ns	4.94 (4.03)	ns	ns	2.48 (2.22)	ns	ns
CD3-CD56+	13.55 (5.00)	ns	ns	15.98 (7.10)	*	ns	10.28 (4.58)	ns	ns	7.79 (4.32)	**	ns
CD3+CD56+	5.14 (5.10)	ns	ns	3.619 (2.90)	ns	ns	3.74 (3.62)	ns	ns	3.79 (4.71)	ns	ns
CD3+	63.17 (8.81)	ns	ns	52.58 (13.12)	ns	ns	63.05 (11.30)	ns	ns	56.01 (14.63)	**	ns
CD4+CD8-	50.18 (11.58)	ns	ns	42.79 (11.84)	ns	ns	50.76 (14.04)	ns	ns	46.16 (15.00)	****	ns
CD4-CD8+	23.78 (8.15)	ns	ns	22.24 (9.20)	*	ns	18.84 (9.82)	***	ns	17.65 (9.46)	*	ns
CD4+:CD8+ ratio	2.11			1.92			2.69			2.61		
CD4hiCD8hi	0.21 (0.15)	ns	ns	0.28 (0.37)	ns	ns	0.29 (0.43)	ns	ns	0.11 (0.12)	ns	ns
CD4hiCD8lo	0.49 (0.35)	ns	ns	0.34 (0.35)	ns	ns	0.40 (0.34)	ns	ns	0.51 (0.49)	ns	ns
CD4loCD8hi	0.79 (0.69)	ns	ns	0.65 (0.888)	ns	ns	0.79 (1.17)	ns	ns	1.00 (1.00)	ns	ns

Results are expressed as median fraction of cells expressing the marker(s) +/- SD among specific gates. Significant differences were evaluated by comparison of controlled-infection (CI) status between profile A and B over time using one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0001$; ****, $p < 0.00001$, ns: not significant.

References

1. Yapar N. 2014. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag* 10:95–105.
2. Arendrup MC. 2010. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care* 16:445–452. <https://doi.org/10.1097/MCC.0b013e32833e84d2>.
3. Liu MB, Xu SR, He Y, Deng GH, Sheng HF, Huang XM, Ouyang CY, Zhou HW. 2013. Diverse vaginal microbiomes in reproductive-age women with vulvovaginal candidiasis. *PLoS One* 8:e79812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079812>.
4. Mason KL, Erb Downward JR, Mason KD, Falkowski NR, Eaton KA, Kao JY, Young VB, Huffnagle GB. 2012. *Candida albicans* and bacterial microbiota interactions in the cecum during recolonization following broad-spectrum antibiotic therapy. *Infect Immun* 80:3371–3380. <https://doi.org/10.1128/IAI.00449-12>.
5. Martínez-Álvarez JA, Pérez-García LA, Flores-Carreón A, Mora-Montes HM. 2014. The immune response against *Candida* spp. and *Sporothrix schenckii*. *Rev Iberoam Micol* 31:62–66. <https://doi.org/10.1016/j.riam.2013.09.015>.
6. Mora-Montes HM, McKenzie C, Bain JM, Lewis LE, Erwig LP, Gow NA. 2012. Interactions between macrophages and cell wall oligosaccharides of *Candida albicans*. *Methods Mol Biol* 845:247–260. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-539-8_16.
7. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. 2012. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol* 10:112–122.
8. Mora-Montes HM, Netea MG, Ferwerda G, Lenardon MD, Brown GD, Mistry AR, Kullberg BJ, O’Callaghan CA, Sheth CC, Odds FC, Brown AJ, Munro CA, Gow NA. 2011. Recognition and blocking of innate immunity cells by *Candida albicans* chitin. *Infect Immun* 79:1961–1970. <https://doi.org/10.1128/IAI.01282-10>.
9. Leroy O, Bailly S, Gangneux JP, Mira JP, Devos P, Dupont H, Montravers P, Perrigault PF, Constantin JM, Guillemot D, Azoulay E, Lortholary O, Bensoussan C, Timsit JF, Amar CSG. 2016. Systemic antifungal therapy for proven or suspected invasive candidiasis: the AmarCAND 2 study. *Ann Intensive Care* 6:2. <https://doi.org/10.1186/s13613-015-0103-7>.
10. Maubon D, Garnaud C, Calandra T, Sanglard D, Cornet M. 2014. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now? *Intensive Care Med* 40:1241–1255. <https://doi.org/10.1007/s00134-014-3404-7>.
11. Bassetti M, Merelli M, Righi E, Diaz-Martin A, Rosello EM, Luzzati R, Parra A, Trecarichi EM, Sanguinetti M, Posteraro B, Garnacho-Montero J, Sartor A, Rello J, Tumbarello M. 2013. Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain. *J Clin Microbiol* 51:4167–4172. <https://doi.org/10.1128/JCM.01998-13>.
12. Meis JF, Ruhnke M, De Pauw BE, Odds FC, Siegert W, Verweij PE. 1999. *Candida dubliniensis* candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow

- transplantation. *Emerg Infect Dis* 5:150–153. <https://doi.org/10.3201/eid0501.990119>.
13. Jabra-Rizk MA, Kong EF, Tsui C, Nguyen MH, Clancy CJ, Fidel PL, Jr, Noverr M. 2016. *Candida albicans* pathogenesis: fitting within the “host- microbe damage response framework.” *Infect Immun* <https://doi.org/10.1128/IAI.00469-16>.
 14. Pappas PG, Kauffman CA, Andes DR, Clancy CJ, Marr KA, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Schuster MG, Vazquez JA, Walsh TJ, Zaoutis TE, Sobel JD. 2016. Executive summary: clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 62:409–417. <https://doi.org/10.1093/cid/civ1194>.
 15. Spellberg B. 2008. Novel insights into disseminated candidiasis: pathogenesis research and clinical experience converge. *PLoS Pathog* 4:e38. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040038>.
 16. Maher CO, Dunne K, Comerford R, O’Dea S, Loy A, Woo J, Rogers TR, Mulcahy F, Dunne PJ, Doherty DG. 2015. *Candida albicans* stimulates IL-23 release by human dendritic cells and downstream IL-17 secretion by Vdelta1 T cells. *J Immunol* 194:5953–5960. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403066>.
 17. Voigt J, Hunniger K, Bouzani M, Jacobsen ID, Barz D, Hube B, Loffler J, Kurzai O. 2014. Human natural killer cells acting as phagocytes against *Candida albicans* and mounting an inflammatory response that modulates neutrophil antifungal activity. *J Infect Dis* 209:616–626. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit574>.
 18. Quintin J, Voigt J, van der Voort R, Jacobsen ID, Verschueren I, Hube B, Giamarellos-Bourboulis EJ, van der Meer JW, Joosten LA, Kurzai O, Netea MG. 2014. Differential role of NK cells against *Candida albicans* infection in immunocompetent or immunocompromised mice. *Eur J Immunol* 44:2405–2414. <https://doi.org/10.1002/eji.201343828>.
 19. Fidel PL, Jr. 2011. *Candida*-host interactions in HIV disease: implications for oropharyngeal candidiasis. *Adv Dent Res* 23:45–49. <https://doi.org/10.1177/0022034511399284>.
 20. Conti HR, Shen F, Nayyar N, Stocum E, Sun JN, Lindemann MJ, Ho AW, Hai JH, Yu JJ, Jung JW, Filler SG, Masso-Welch P, Edgerton M, Gaffen SL. 2009. Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis. *J Exp Med* 206:299–311. <https://doi.org/10.1084/jem.20081463>.
 21. Liang SC, Tan XY, Luxenberg DP, Karim R, Dunussi-Joannopoulos K, Collins M, Fouser LA. 2006. Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides. *J Exp Med* 203:2271–2279. <https://doi.org/10.1084/jem.20061308>.
 22. Guarner J, Brandt ME. 2011. Histopathologic diagnosis of fungal infections in the 21st century. *Clin Microbiol Rev* 24:247–280. <https://doi.org/10.1128/CMR.00053-10>.
 23. Albano D, Bosio G, Bertoli M, Petrilli G, Bertagna F. 2016. Hepatosplenic candidiasis detected by (18)F-FDG-PET/CT. *Asia Ocean J Nucl Med Biol* 4:106–108.
 24. Hoarau G, Kerdraon O, Lagree M, Vinchon M, Francois N, Dubos F, Sendid B. 2013. Detection of (1,3)-beta-D-glucans in situ in a *Candida albicans* brain granuloma. *J Infect* 67:622–624.

<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2013.08.002>.

25. Song Z, Papanicolaou N, Dean S, Bing Z. 2012. Localized candidiasis in kidney presented as a mass mimicking renal cell carcinoma. *Case Rep Infect Dis* 2012:953590.
26. Ogura M, Kagami S, Nakao M, Kono M, Kanetsuna Y, Hosoya T. 2012. Fungal granulomatous interstitial nephritis presenting as acute kidney injury diagnosed by renal histology including PCR assay. *Clin Kidney J* 5:459 – 462. <https://doi.org/10.1093/ckj/sfs103>.
27. Kontoyiannis DP, Luna MA, Samuels BI, Bodey GP. 2000. Hepatosplenic candidiasis. A manifestation of chronic disseminated candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 14:721–739. [https://doi.org/10.1016/S0891-5520\(05\)70128-8](https://doi.org/10.1016/S0891-5520(05)70128-8).
28. Cheng S, Clancy CJ, Hartman DJ, Hao B, Nguyen MH. 2014. *Candida glabrata* intra-abdominal candidiasis is characterized by persistence within the peritoneal cavity and abscesses. *Infect Immun* 82:3015–3022. <https://doi.org/10.1128/IAI.00062-14>.
29. Castillo L, MacCallum DM, Brown AJ, Gow NA, Odds FC. 2011. Differential regulation of kidney and spleen cytokine responses in mice challenged with pathology-standardized doses of *Candida albicans* mannosylation mutants. *Infect Immun* 79:146 –152. <https://doi.org/10.1128/IAI.01004-10>.
30. MacCallum DM. 2009. Massive induction of innate immune response to *Candida albicans* in the kidney in a murine intravenous challenge model. *FEMS Yeast Res* 9:1111–1122. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00576.x>.
31. Netea MG, Joosten LA, van der Meer JW, Kullberg BJ, van de Veerdonk FL. 2015. Immune defence against *Candida* fungal infections. *Nat Rev Immunol* 15:630 – 642. <https://doi.org/10.1038/nri3897>.
32. Tóth A, Csonka K, Jacobs C, Vagvolgyi C, Nosanchuk JD, Netea MG, Gacser A. 2013. *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* induce different T-cell responses in human peripheral blood mononuclear cells. *J Infect Dis* 208:690–698. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit188>.
33. Dementhon K, El-Kirat-Chatel S, Noel T. 2012. Development of an in vitro model for the multi-parametric quantification of the cellular interactions between *Candida* yeasts and phagocytes. *PLoS One* 7:e32621. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032621>.
34. Svobodová E, Staib P, Losse J, Hennicke F, Barz D, Jozsi M. 2012. Differential interaction of the two related fungal species *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* with human neutrophils. *J Immunol* 189:2502–2511. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1200185>.
35. Nagy I, Filkor K, Nemeth T, Hamari Z, Vagvolgyi C, Gacser A. 2011. In vitro interactions of *Candida parapsilosis* wild type and lipase deficient mutants with human monocyte derived dendritic cells. *BMC Microbiol* 11:122. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-122>.
36. Neumann AK, Jacobson K. 2010. A novel pseudopodial component of the dendritic cell anti-fungal response: the fungipod. *PLoS Pathog* 6:e1000760. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000760>.
37. Guirado E, Mbawuike U, Keiser TL, Arcos J, Azad AK, Wang SH, Schlesinger LS. 2015. Characterization of host and microbial determinants in individuals with latent tuberculosis

- infection using a human granuloma model. *mBio* 6:e02537-14. <https://doi.org/10.1128/mBio.02537-14>.
38. Hogan LH, Wang M, Suresh M, Co DO, Weinstock JV, Sandor M. 2002. CD4 TCR repertoire heterogeneity in *Schistosoma mansoni*-induced granulomas. *J Immunol* 169:6386 – 6393. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.11.6386>.
 39. Altare F, Durandy A, Lammas D, Emile JF, Lamhamedi S, Le Deist F, Drysdale P, Jouanguy E, Doffinger R, Bernaudin F, Jeppsson O, Gollob JA, Meinel E, Segal AW, Fischer A, Kumararatne D, Casanova JL. 1998. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science* 280:1432–1435. <https://doi.org/10.1126/science.280.5368.1432>.
 40. Alvarez-Rueda N, Albassier M, Allain S, Deknuydt F, Altare F, Le Pape P. 2012. First human model of in vitro *Candida albicans* persistence within granuloma for the reliable study of host-fungi interactions. *PLoS One* 7:e40185. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040185>.
 41. Romani L. 2011. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 11: 275–288. <https://doi.org/10.1038/nri2939>.
 42. Gil ML, Gozalbo D. 2009. Role of Toll-like receptors in systemic *Candida albicans* infections. *Front Biosci (Landmark ed)* 14:570–582.
 43. Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. 2011. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell* 10:1173–1182. <https://doi.org/10.1128/EC.05085-11>.
 44. Tóth R, Alonso MF, Bain JM, Vagvolgyi C, Erwig LP, Gacser A. 2015. Different *Candida parapsilosis* clinical isolates and lipase deficient strain trigger an altered cellular immune response. *Front Microbiol* 6:1102.
 45. Lewis RE. 2009. Overview of the changing epidemiology of candidemia. *Curr Med Res Opin* 25:1732–1740.
 46. Bhavanam S, Rayat GR, Keelan M, Kunimoto D, Drews SJ. 2016. Understanding the pathophysiology of the human TB lung granuloma using in vitro granuloma models. *Future Microbiol* 11:1073–1089. <https://doi.org/10.2217/fmb-2016-0005>.
 47. Subbian S, Tsenova L, Kim MJ, Wainwright HC, Visser A, Bandyopadhyay N, Bader JS, Karakousis PC, Murrmann GB, Bekker LG, Russell DG, Kaplan G. 2015. Lesion-specific immune response in granulomas of patients with pulmonary tuberculosis: a pilot study. *PLoS One* 10:e0132249. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132249>.
 48. Gideon HP, Phuah J, Myers AJ, Bryson BD, Rodgers MA, Coleman MT, Maiello P, Rutledge T, Marino S, Fortune SM, Kirschner DE, Lin PL, Flynn JL. 2015. Variability in tuberculosis granuloma T cell responses exists, but a balance of pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with sterilization. *PLoS Pathog* 11:e1004603. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004603>.
 49. Girgis NM, Gundra UM, Ward LN, Cabrera M, Frevert U, Loke P. 2014. Ly6C(high) monocytes become alternatively activated macrophages in schistosome granulomas with help from CD4+ cells. *PLoS Pathog* 10: e1004080. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004080>.
 50. Aoun J, Habib R, Charaffeddine K, Taraif S, Loya A, Khalifeh I. 2014. Caseating granulomas

in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e3255. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003255>.

51. Donaghy L, Cabillic F, Corlu A, Rostan O, Toutirais O, Guguen-Guillouzo C, Guiguen C, Gangneux JP. 2010. Immunostimulatory properties of dendritic cells after *Leishmania donovani* infection using an in vitro model of liver microenvironment. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e703. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000703>.
52. Heninger E, Hogan LH, Karman J, Macvilay S, Hill B, Woods JP, Sandor M. 2006. Characterization of the *Histoplasma capsulatum*-induced granuloma. *J Immunol* 177:3303–3313. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.5.3303>.
53. Fitzpatrick DA, O’Gaora P, Byrne KP, Butler G. 2010. Analysis of gene evolution and metabolic pathways using the *Candida* Gene Order Browser. *BMC Genomics* 11:290. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-290>.
54. Gazendam RP, van Hamme JL, Tool AT, van Houdt M, Verkuijlen PJ, Herbst M, Liese JG, van de Veerdonk FL, Roos D, van den Berg TK, Kuijpers TW. 2014. Two independent killing mechanisms of *Candida albicans* by human neutrophils: evidence from innate immunity defects. *Blood* 124:590–597. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-01-551473>.
55. Lionakis MS, Netea MG. 2013. *Candida* and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis. *PLoS Pathog* 9:e1003079. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003079>.
56. Kenno S, Perito S, Mosci P, Vecchiarelli A, Monari C. 2016. Autophagy and reactive oxygen species are involved in neutrophil extracellular traps release induced by *C. albicans* morphotypes. *Front Microbiol* 7:879.
57. McDonald B, Urrutia R, Yipp BG, Jenne CN, Kubes P. 2012. Intravascular neutrophil extracellular traps capture bacteria from the bloodstream during sepsis. *Cell Host Microbe* 12:324–333. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2012.06.011>.
58. Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytniuk LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC, Malawista SE, de Boisleury Che- vance A, Zhang K, Conly J, Kubes P. 2012. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med* 18:1386–1393. <https://doi.org/10.1038/nm.2847>.
59. Pillay J, den Braber I, Vrizekoop N, Kwast LM, de Boer RJ, Borghans JA, Tesselaar K, Koenderman L. 2010. In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. *Blood* 116:625–627. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-01-259028>.
60. Kim J, Kim DS, Lee YS, Choi NG. 2011. Fungal urinary tract infection in burn patients with long-term foley catheterization. *Korean J Urol* 52: 626–631. <https://doi.org/10.4111/kju.2011.52.9.626>.
61. Gazendam RP, van de Geer A, van Hamme JL, Tool AT, van Rees DJ, Aarts CE, van den Biggelaar M, van Alphen F, Verkuijlen P, Meijer AB, Janssen H, Roos D, van den Berg TK, Kuijpers TW. 2016. Impaired killing of *Candida albicans* by granulocytes mobilized for transfusion purposes: a role for granule components. *Haematologica* <https://doi.org/10.3324/haematol.2015.136630>.
62. Espinosa V, Jhingran A, Dutta O, Kasahara S, Donnelly R, Du P, Rosenfeld J, Leiner I, Chen

- CC, Ron Y, Hohl TM, Rivera A. 2014. Inflammatory monocytes orchestrate innate antifungal immunity in the lung. *PLoS Pathog* 10:e1003940. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003940>.
63. Ramirez-Ortiz ZG, Means TK. 2012. The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (*A. fumigatus*, *C. neoformans* and *C. albicans*). *Virulence* 3:635–646. <https://doi.org/10.4161/viru.22295>.
64. Sandilands GP, Ahmed Z, Perry N, Davison M, Lupton A, Young B. 2005. Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules required for antigen presentation and T-cell activation. *Immunology* 114:354–368. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.02114.x>.
65. Pahar B, Lackner AA, Veazey RS. 2006. Intestinal double-positive CD4+CD8+ T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines. *Eur J Immunol* 36:583–592. <https://doi.org/10.1002/eji.200535520>.
66. Naseem S, Frank D, Konopka JB, Carpino N. 2015. Protection from systemic *Candida albicans* infection by inactivation of the Sts phosphatases. *Infect Immun* 83:637–645. <https://doi.org/10.1128/IAI.02789-14>.
67. Jones-Carson J, Vazquez-Torres FA, Balish E. 1997. B cell-independent selection of memory T cells after mucosal immunization with *Candida albicans*. *J Immunol* 158:4328–4335.
68. Beno DW, Stover AG, Mathews HL. 1995. Growth inhibition of *Candida albicans* hyphae by CD8+ lymphocytes. *J Immunol* 154:5273–5281.
69. Milner JD, Sandler NG, Douek DC. 2010. Th17 cells, Job's syndrome and HIV: opportunities for bacterial and fungal infections. *Curr Opin HIV AIDS* 5:179–183. <https://doi.org/10.1097/COH.0b013e328335ed3e>.
70. Delgado AC, de Jesus Pedro R, Aoki FH, Resende MR, Trabasso P, Colombo AL, de Oliveira MS, Mikami Y, Moretti ML. 2009. Clinical and microbiological assessment of patients with a long-term diagnosis of human immunodeficiency virus infection and *Candida* oral colonization. *Clin Microbiol Infect* 15:364–371. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02707.x>.
71. Romani L, Mencacci A, Cenci E, Spaccapelo R, Mosci P, Puccetti P, Bistoni F. 1993. CD4+ subset expression in murine candidiasis. Th responses correlate directly with genetically determined susceptibility or vaccine-induced resistance. *J Immunol* 150:925–931.
72. Romani L, Cenci E, Menacci A, Bistoni F, Puccetti P. 1995. T helper cell dichotomy to *Candida albicans*: implications for pathology, therapy, and vaccine design. *Immunol Res* 14:148–162. <https://doi.org/10.1007/BF02918174>.
73. Ghaleb M, Hamad M, Abu-Elteen KH. 2003. Vaginal T lymphocyte population kinetics during experimental vaginal candidosis: evidence for a possible role of CD8+ T cells in protection against vaginal candidosis. *Clin Exp Immunol* 131:26–33. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02032.x>.
74. Paulovicová E, Machova E, Tulinska J, Bystricky S. 2007. Cell and antibody mediated immunity induced by vaccination with novel *Candida dubliniensis* mannan immunogenic

- conjugate. *Int Immunopharmacol* 7:1325–1333. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.05.014>.
75. Martinez-Gallo M, Puy C, Ruiz-Hernandez R, Rodriguez-Arias JM, Bofill M, Nomdedeu JF, Cigudosa JC, Rodriguez-Sanchez JL, de la Calle-Martin O. 2008. Severe and recurrent episodes of bronchiolitis obliterans organising pneumonia associated with indolent CD4+ CD8+ T-cell leukaemia. *Eur Respir J* 31:1368–1372. <https://doi.org/10.1183/09031936.00061907>.
76. Ahmad E, Fatima MT, Saleemuddin M, Owais M. 2012. Plasma beads loaded with *Candida albicans* cytosolic proteins impart protection against the fungal infection in BALB/c mice. *Vaccine* 30:6851–6858. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2012.09.010>.
77. Martinez-Martinez L, Martinez-Saavedra MT, Fuentes-Prior P, Barnadas M, Rubiales MV, Noda J, Badell I, Rodriguez-Gallego C, de la Calle-Martin O. 2015. A novel gain-of-function STAT1 mutation resulting in basal phosphorylation of STAT1 and increased distal IFN-gamma-mediated responses in chronic mucocutaneous candidiasis. *Mol Immunol* 68: 597–605. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2015.09.014>.
78. Barelle CJ, Manson CL, MacCallum DM, Odds FC, Gow NA, Brown AJ. 2004. GFP as a quantitative reporter of gene regulation in *Candida albicans*. *Yeast* 21:333–340. <https://doi.org/10.1002/yea.1099>.

Article n°2

**Première description de la présence de
lymphocytes T doubles positifs
CD4^{lo}CD8^{hi} au cours de
l'interaction hôte-*C. albicans* :
régulateurs importants de la persistance
fongique ?**

Au cours des candidoses chroniques disséminées et cutanéomuqueuses, la réaction inflammatoire mise en place vise à contrôler la prolifération de *Candida* et à limiter sa dissémination vers les tissus environnants. Dans la plupart des cas, cette réaction aboutit à l'apparition de micro-abcès au niveau des organes profonds et des muqueuses. De façon fréquente, il a toutefois été observé au cours des infections chroniques à *Candida* la mise en place d'une autre réaction dite d'hypersensibilité retardée de type IV, connue sous le nom de réaction granulomateuse. Cette réaction inflammatoire cellulaire peut être concomitante à la présence de micro-abcès ou peut apparaître seule de façon plus rare. Les descriptions histopathologiques montrent des micro-abcès nécrotiques ou fibrotiques pouvant être accompagnés d'une réaction cellulaire complexe et granulomateuse.

Ces structures granulomateuses, composées de cellules immunes entourant le pathogène, ont pour but de circonscrire la dissémination fongique. Bien que les connaissances sur l'immunité innée contre *C. albicans* soient de plus en plus précises, encore peu de choses sont connues sur la réponse granulomateuse locale qui semble être une interface importante dans le contrôle de cette infection.

Un modèle de granulome *in vitro* a été récemment mis au point au laboratoire. Celui-ci consiste en l'infection de cellules immunes périphériques (PBMCs et PNNs) de donneurs sans immunodéficience apparente avec des blastoconidies de *C. albicans*. La formation de structures granulomateuses classiques qui sont composées de cellules structurées autour du pathogène, le tout entouré par des lymphocytes T. Dans ces conditions, la charge fongique est contrôlée pendant les trois premiers jours post infection par les cellules immunes, puis elle augmente significativement dans les granulomes jusqu'à 6 jours post-infection.

Une seconde étude a montré que l'évolution de la formation du granulome variait en fonction de l'espèce utilisée lors de l'infection initiale. Par ailleurs, alors que la plupart des sujets étaient incapables de contrôler le développement de *Candida*, deux donneurs l'avaient progressivement contrôlé après six jours.

Les analyses de cytométrie en flux des sous-populations de lymphocytes T au sein des structures granulomateuses au cours du temps indiquent que les granulomes contiennent à la fois les sous-populations de T CD4⁺ et T CD8⁺. Alors que les proportions de T CD4⁺ sont stables au cours du temps, les proportions de T CD8⁺ sont réduites significativement après 6 jours. Nous avons donc voulu caractériser les populations de lymphocytes T et de doubles positifs CD4⁺CD8⁺ afin d'expliquer les fluctuations du ratio CD4⁺/CD8⁺. Les sous populations de lymphocytes T doubles positifs CD4⁺CD8⁺ : CD4^{lo}CD8^{hi}, CD4^{hi}CD8^{hi} et CD4^{hi}CD8^{lo} sont décrites comme des cellules effectrices, importantes notamment dans la

régulation de la réponse immune et leur fréquence augmente lors d'infections virales. Dans cette étude, nous avons exploré les différentes sous populations de lymphocytes T doubles positifs présentes au sein des structures granulomateuses. De façon intéressante, cette étude met en évidence pour la première fois une proportion significativement plus importante de lymphocytes T doubles positifs CD4^{lo}CD8^{hi} dans les granulomes quand l'infection persiste. En définissant la fonction de cette sous-population cellulaire au cours des infections à *Candida*, il semblerait possible d'expliquer les évènements cellulaires conditionnant le contrôle ou la persistance fongique.

First description of CD4^{lo}CD8^{hi} double-positive T cells during human *Candida albicans* infection: key regulators of fungal persistence?

Nidia Alvarez-Rueda¹, Barbara Misme-Aucouturier¹, Marjorie Albassier¹, Francine Jotereau², Frédéric Altare², Patrice Le Pape¹

¹Département de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Université de Nantes, Nantes Atlantique Universités, EA1155 – IICiMed, Institut de Recherche en Santé 2, Nantes, Pays de Loire, France
²U892, INSERM, Nantes, France, Université de Nantes.

During persistent and chronic candidiasis, a delayed-type of hypersensitivity known as granuloma is formed at the tissue level to avoid fungal dissemination. Although there is a growing understanding of innate immunity against *C. albicans*, little is known about the local granulomatous response that could be a key interface in the control of infection. We have previously developed an *in vitro* granuloma model that consists of peripheral human immune cells infected with *C. albicans*, resulting in the formation of a classical granulomatous reaction where phagocytic cells surrounded by T lymphocytes. The focus of this work was to study the dynamics of T cells into granulomas, related to the fungal burden evolution. Human peripheral blood immune cells from ten subjects without any apparent immunodeficiency were challenged by four *C. albicans* clinical isolates to induce granuloma formation. Our results highlight that fungal burden is controlled during the first three days after challenge by all immune cells from ten analyzed subjects. Six days postinfection, *C. albicans* burden significantly increased in granulomas from eight subjects. Surprisingly, infection was progressively controlled over six days in granulomas from two individuals. We performed several flow cytometry analyzes of T lymphocyte subsets within granulomatous structures over time. The flow cytometry analysis of the CD3⁺ T cell compartment indicated that granulomas contain both CD4⁺ and CD8⁺ T cells subsets. Whereas CD4⁺ proportions are stable over the time, CD8⁺ proportions are significantly reduced six days after challenge. Interestingly, this study highlight for the first time that significantly higher proportion of CD4^{lo}CD8^{hi} T cells infiltrates granulomas when infection persists. By defining the function of this cells subset during *Candida* infections, it would be possible to explain cellular events conditioning infection control or fungal persistence outcomes.

Importance

During chronic hepatosplenic and mucocutaneous candidiasis, a delayed-type of hypersensitivity known as granuloma is formed at the tissue level. These structures are local interfaces between fungus and human immune cells determining fungal control or persistence. Here we describe the formation of granulomas after infection of immune cells from different subjects with *C. albicans* clinical isolates. While the fungal burden is controlled during the first days, our results support that granulomas can lead *C. albicans* persistence or exceptionally its control. For the first time, the presence of significantly higher proportions of CD4^{lo}CD8^{hi} T cell subset infiltrating granulomas was identified when infection persists compared to granulomas in which infection was controlled. By defining the function of this cells subset during chronic *Candida* infections, it would be possible to explain one of the cellular events conditioning infection control or fungal persistence outcomes. The discovery of these cells could have potentially implications in the exploration of novel antifungal strategies.

Candida albicans is a commensal saprophytic organism colonizing the human gastrointestinal mucosa, genitourinary system and skin microbiota (1, 2). Healthy subjects conserve *C. albicans* in the commensal state after immune sensing through recognition of the fungus by specific receptors. The fungus evolutionarily co-exists with humans without causing damage, indicating the existence of sophisticated survival mechanisms to antagonize immunity (3, 4). Despite human immune sensing, opportunistic invasive fungal infections (IFI) due to *C. albicans* occur in patients with hematologic disorders, and solid and hematopoietic organ transplantations, during anti-TNF- α therapy (5). The incidence of invasive candidiasis has been estimated at 1.5 to 8 per 100,000 global population (6-7, <http://www.gaffi.org/>). The high mortality rate (30 to 50%) renders these invasive infections an important public health challenge (8).

The current understanding of *C. albicans* infections indicates that blastoconidia, hyphae and fungal antigens induce the recruitment of multiple immune cell populations around localized areas of infection. A delayed-type of hypersensitivity, called granulomas, is formed in order to circumvent infection and avoid systemic dissemination (9). Nevertheless, like other infectious granulomas, this multicellular response can also be detrimental for humans and can not control the fungal dissemination (10-13). The most compelling evidence

of a “dark side” of *Candida* granulomas comes from clinical studies showing that a heightened inflammatory response induced by *C. albicans* occurs at the expense of host damage and pathogen eradication. Hence, the fungal pathogen induces a bidirectional influence between infection and immune-related pathology. An uncontrolled immune response may eventually oppose disease eradication. For example, during chronic disseminated candidiasis (CDC), also known as hepatosplenic candidiasis, and chronic mucocutaneous candidiasis diseases (CMCD), a local and systemic inflammatory reaction results in quiescent pathogens (14-16).

This pathophysiological evidence was confirmed in our lab by the formation of *in vitro* granulomas over time after challenge with *C. albicans* of human immune cells from immunocompetent individuals (17). Despite considerable candidacidal activity of human phagocytes during the first two days after infection, *C. albicans* was not completely eliminated by immunocompetent cells six days later. The remaining yeasts and hyphae proliferated and persisted within *in vitro* human granulomas. This observation suggests that an inadequate or uncontrolled inflammatory response against *C. albicans* may eventually oppose infection eradication. Because this human granuloma model has only recently become available, and cases of human fungal granulomas are poorly studied, the precise relationships between immune and fungal cells within the granuloma microenvironment are poorly understood. However, a large body of work on antifungal immunity has demonstrated that resistance to candidiasis requires the coordinated action of innate and adaptive immune defenses (18-21). Activation of monocytes and neutrophils depends on an intact cooperation with T lymphocytes (22). In this context, approaches are required that include the complex and dynamic monitoring of immune and fungal cell interactions over time.

In order to evaluate the dynamics of granuloma formation at a cellular level, T lymphocyte kinetics were evaluated after inoculating peripheral blood cells from healthy subjects with *C. albicans* (17). Changes in T lymphocyte populations were studied by flow cytometry regarding the expression of CD4 and CD8 trans-membrane proteins. Based on the exclusive expression of CD4 and CD8 co-receptors, we showed that CD4⁺ cells increased six days after infection. Interestingly, the ratio of CD4⁺/CD8⁺ T lymphocytes was higher in granulomas than in uninfected controls. By analyzing the results, we observed the expression of a small proportion of double-positive CD4⁺ CD8⁺ lymphocytes in fungal granulomas six days after inoculation. Total CD4⁺ CD8⁺ lymphocytes have previously been observed during vaginal inoculation of *C. albicans* into estrogen-conditioned mice (23). Another study observed that mice immunization with mannan-HSA conjugates from *C. dubliniensis* induced

a significant rise in CD4⁺ CD8⁺ T cells (24). However, the functional properties of these cells during human *C. albicans* infections have never been studied. Based on these observations, we conducted new research to provide more information about the dynamics of T lymphocyte populations in granulomas associated with fungal elimination or uncontrolled persistence.

In this study, the ability of four *C. albicans* clinical isolates to induce granulomas after inoculation of human peripheral blood immune cells from ten subjects without any apparent immunodeficiency was investigated. The kinetics of cellular interactions, in terms of fungal burden evolution and T double-positive CD4⁺ CD8⁺ lymphocytes recruitment, were evaluated.

In vitro* infection of human peripheral blood cells with *C. albicans

C. albicans clinical isolates (Caal93, Caal121, Caal123 and Caal124) were provided by the Parasitology and Medical Mycology Department (EA1155 IICiMed), University of Nantes, France. One colony from each clinical isolate was picked from YPD agar (1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose, 2% agar), transferred to YPD liquid medium and incubated overnight at 30°C in a shaking incubator. After washing in phosphate-buffered saline, blastoconidia were suspended in RPMI 1640 with 8% heat-inactivated pooled human serum (HS) at a concentration of 10⁶ cells/ml.

Peripheral blood samples were obtained from healthy subjects at the Etablissement Français du Sang, Pays de la Loire (Nantes, France). All the analyses presented were performed according to the principle expressed in the Helsinki Declaration. Peripheral blood mononuclear and polynuclear cells were isolated by gradient density sedimentation, using LMS 1077 (PAA Laboratories, Austria) lymphocyte separation medium, as described by Altare *et al.* 1998 (25). For co-culture experiments, human immune cells were adjusted to a final concentration of 10⁶ cells/ml in RPMI medium, supplemented with 8% HS. Yeast cells were added at a Multiplicity of Infection (MOI) ratio of 2000:1 and incubated at 37°C, 5% CO₂. Granuloma formation was followed daily by light microscopy. Uninfected cells were used as a negative control.

Evolution of the fungal burden in granulomas

Like other infectious granulomas described in the literature, *C. albicans* elicited immune cell aggregation (10-13). Between 4th and 6th days after inoculation, well distinguishable

multicellular and multilayered structures, characteristic of granulomas, were identified. At that time, the four clinical isolates of *C. albicans* were able to form granulomas. Fig. 1a shows representative granulomatous structures observed six days after inoculation under light microscopy. Levels of *C. albicans* proliferation into granulomas were evaluated at different time points following inoculation. The candidacidal activity of human immune cells was measured by counting the living yeasts with a colony-counting technique (colony-forming unit, CFU). The fungal burden was expressed by the mean of CFU/ml for the four clinical isolates and the ten subjects. Consistent with the previous work, the results showed that phagocytes displayed a high candidacidal activity during the first 3 days postinfection for all of the *C. albicans* isolates. Then, the surviving yeasts were responsible for a significant and rapid increase in the fungal burden from the fourth to the sixth day postinfection (Fig. 1b). We then analyzed whether each clinical isolates had an effect on fungal burden evolution. The results showed that the fungal burden evolution within granulomatous structures was not significantly different between the four clinical isolates of *C. albicans* six days after inoculation. In contrast, when it was analyzed for each subject, a strong variability in the fungal burden was identified on days 4 and 6 postinfection, reflecting a high inter-individual variability (Fig. 1c). Based on the evolution of the fungal burden within granulomas, two subjects (S9 and S10) were observed that could resolve *C. albicans* infection in up to six days (fungal burden lower than 100 CFU/ml). The fungal burden of eight other individuals was higher than 100 CFU/ml.

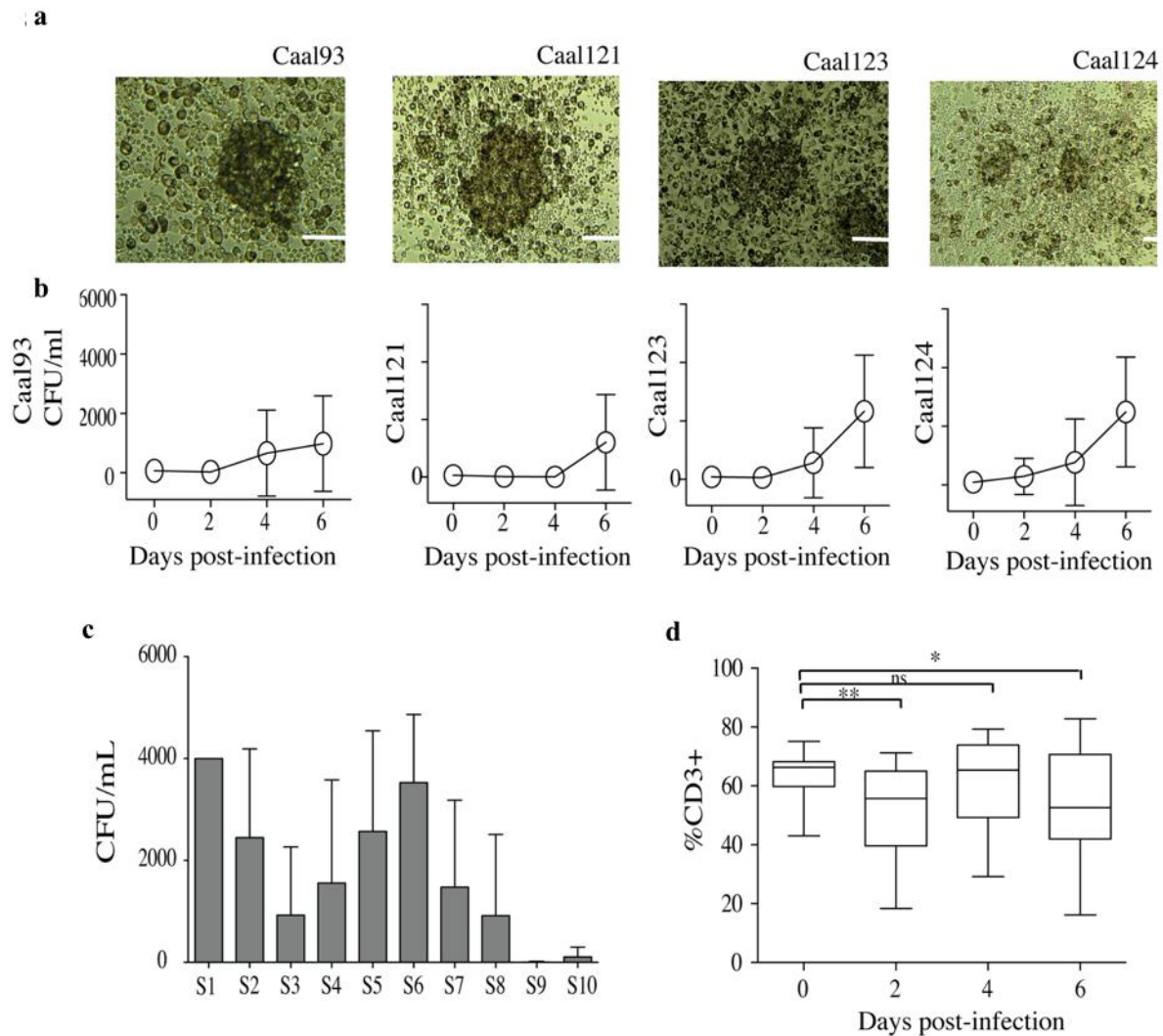


FIG. 1. *C. albicans* strains elicited a granulomatous response after infection of human immune cells from immunocompetent subjects. (a) Representative granulomatous response observed under light microscopy six days after challenge of human mononuclear and polynuclear peripheral blood cells with living yeasts from different *Candida* species (MOI phagocyte to yeast of 2000:1). Bars represent 50 μ m. No formation of granulomas was observed in uninfected conditions for up to six days postinfection. (b) The fungal burden was followed at 0, 2, 4 and 6 days postinfection and expressed as colony-forming units per ml (CFU/ml). Data were represented as the mean \pm SEM of the fungal burden of four clinical isolates of *C. albicans* from granulomas of ten subjects: *C. albicans* Caal93, Caal121, Caal123 and Caal124, n = 40. (c) Fungal burden six days after infection of ten subjects (S1-S10) against four *C. albicans* clinical isolates. (d) Peripheral blood mononuclear and polynuclear cells from ten subjects were infected with four *C. albicans* clinical isolates for up to 6 days. The granulomatous structures were collected from co-culture plates at different time points, and stained with a cocktail of fluorescent-conjugated antibodies specific to CD3, CD4 and CD8 lymphocytes. The proportions of CD3+ cells within granulomatous structures were expressed as percentage.

CD4^{lo}CD8^{hi} DP cells infiltrate human fungal granulomas

To assess whether the host immune cells had an impact on the evolution of *Candida* fungal burdens, several flow cytometry analyses of T lymphocyte subsets within granulomatous structures were performed over time. Granuloma structures from co-cultures were washed in phosphate-buffered saline containing 2% FBS and collected at different time points under light microscopy. The cells were suspended in the same buffer and stained with a cocktail of fluorescent-conjugated antibodies. The antibodies (MACS Miltenyi Biotec) were specific to CD3-VioBlue (clone BW264/56), CD4-FITC (clone VIT4) and CD8-PE (clone BW135/80). Cells were incubated for 1 h at 4°C in the dark, washed twice with PBS and analyzed by flow cytometry. All data were acquired using a FACS Canto II instrument (BD Biosciences) and analyzed with FlowJO software version 9.4.10 (Tree Star Inc.) and DIVA software version 6.2 (BD Biosciences). The proportions of CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ simple-positive T cells were analyzed in the global lymphoid compartment. After gating on CD3 lymphocytes, the CD3⁺ population was separated into CD4⁺ and CD8⁺ T cells. The expression of CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) cells within granulomas was investigated by gating CD4^{lo}CD8^{hi}, CD4^{hi}CD8^{hi}, and CD4^{hi}CD8^{lo} subsets in the CD3⁺ compartment.

The CD3⁺ T cell proportions within granulomas were significantly reduced six days after infection with *C. albicans* ($p = 0.05$ versus day 0) (Fig. 1d). To assess whether CD4⁺ or CD8⁺ T cells had an impact on CD3⁺ T cell evolution, the percentage of each population was analyzed over time. The proportion of CD4⁺ T cells was stable over time (ranging from 52% to 63%) and tended to increase only six days postinfection. In contrast, the proportion of CD8⁺ T cells was significantly reduced on day 6 compared to day 0 (Fig. 2a). These observations are in agreement with studies reporting that the CD4⁺ T helper-mediated response plays a pivotal role in anti-*Candida* host defenses (3, 26, 27). However, we highlight that the recruitment of CD4⁺ cells is delayed within *C. albicans* granulomas, which could lead to fungal dissemination. The function of CD8⁺ cells in resistance to candidiasis has also been reported, but contradicted in other studies. The cytotoxicity and cytokine production by CD8⁺ cells is necessary to restrict infection (28-30). Our observations suggest that the inflammatory response by CD8⁺ cells is not sufficient to oppose infection eradication.

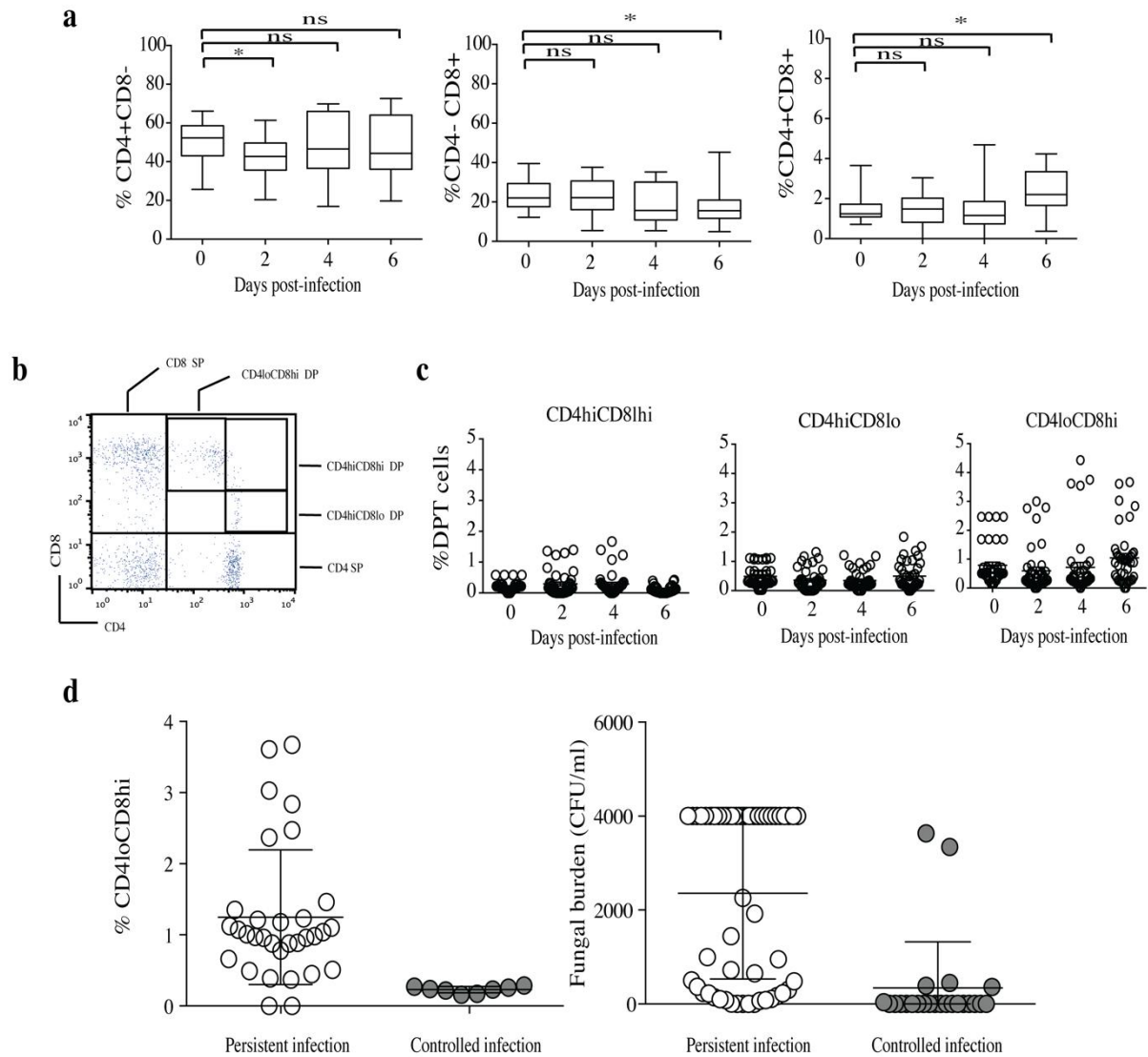


FIG. 2. Characterization of T cells within *C. albicans* granulomas. Peripheral blood mononuclear and polynuclear cells from ten subjects were infected with four *C. albicans* clinical isolates for up to 6 days. The granulomatous structures were collected from co-culture plates at different time points, and stained with a cocktail of fluorescent-conjugated antibodies specific to CD3, CD4 and CD8 lymphocytes. **(a)** The proportions of CD4+, CD8+ and total DP T cells within granulomatous structures were expressed as percentage of the total CD3+ compartment. Box plots depict median, min and max percentages of these populations over time. **(b)** Representative flow-cytometry analysis showing CD4+, CD8+ and CD4+CD8+ DP cells after gating on CD3+ lymphocytes. **(c)** The proportions of CD4hiCD8hi, CD4hiCD8lo and CD4loCD8hi cells within granulomatous structures were expressed as percentage of the total DP compartment. **(d)** Percentage of CD4loCD8hi cells in persistent-infection and controlled-infection granulomatous structures. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.001$; ***, $p < 0.0001$; ****, $p < 0.00001$ (by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons test) ($n = 40$).

The CD4+CD8+ DP cells in the CD3+ compartment were analyzed in order to investigate the origin of the relative reduction in CD8+ six days postinfection. Fig. 2b shows a representative flow-cytometry analysis showing CD4+CD8+ DP cells after gating on CD3+ lymphocytes.

The average proportions of CD4^{hi}CD8^{hi} and CD4^{hi}CD8^{lo} were not significantly different over time (Fig. 2c). Interestingly, significantly higher proportions of CD4^{lo}CD8^{hi} T cells were found within granulomatous structures six days postinfection.

By analyzing the proportions of DP T cells in relation to the evolution of the fungal burden six days after challenge, we highlighted a significantly higher proportion of CD4^{lo}CD8^{hi} T cells in granulomas from subjects in which infection was not resolved, compared to granulomas in which infection was controlled (Fig. 2d). These observations suggest, for the first time, that human CD4^{lo}CD8^{hi} DP T cells infiltrate *C. albicans* granulomatous structures during the late stages after challenge. This cell subset significantly infiltrated those granulomas with persistent-infection status rather than those with a controlled-infection status. These findings correlate with those reporting that a strong antigenic challenge, such as widespread viral or bacterial infections, is associated with an increase in the proportions of DP T cells in peripheral blood (31). The functions and phenotypic characteristics of this specific T cell subset during candidiasis are still unknown. In estrogen-conditioned mice, CD4⁺CD8⁺ lymphocytes have previously been detected during vaginal inoculation of *C. albicans* (23). Another study observed that rabbit immunization with mannan–human serum albumin conjugates from *C. dubliniensis* induced a significant increase of CD4⁺ CD8⁺ T cells (24). The CD4^{hi}CD8^{lo} DP T cells, that express the CD8 $\alpha\alpha$, show regulatory characteristics. These cells have identified on the surface of the colon and in the blood and seems to be activated by the bacteria *Faecalibacterium prausnitzii* (32).

Further studies are necessary to understand better the function of these regulatory populations and their role in *C. albicans* granulomas. By defining their precise cellular orchestration during *Candida* infections, it would be possible to manipulate these responses in the infection site to enhance their effector functions.

Acknowledgments

We thank Erwan Mortier from the INSERM UMR 892, CRCNA, Nantes for valuable suggestions and reading the manuscript. We also thank the healthy donors included in this study. We thank the Cytometry Facility Cytocell for expert technical assistance.

Funding

This work was supported by the Alliance de Recherche sur les Maladies Infectieuses (ARMINA), Région Pays de Loire 2012-2016 and the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France).

References

1. Underhill DM, Pearlman E. Immune Interactions with Pathogenic and Commensal Fungi: A Two-Way Street. *Immunity*. 2015;43(5):845-58. doi: 10.1016/j.immuni.2015.10.023. PubMed PMID: 26588778.
2. Perez JC, Kumamoto CA, Johnson AD. *Candida albicans* commensalism and pathogenicity are intertwined traits directed by a tightly knit transcriptional regulatory circuit. *PLoS Biol*. 2013;11(3):e1001510. doi: 10.1371/journal.pbio.1001510. PubMed PMID: 23526879; PubMed Central PMCID: PMC3601966.
3. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(4):275-88. doi: 10.1038/nri2939. PubMed PMID: 21394104.
4. Perez JC, Johnson AD. Regulatory circuits that enable proliferation of the fungus *Candida albicans* in a mammalian host. *PLoS Pathog*. 2013;9(12):e1003780. doi: 10.1371/journal.ppat.1003780. PubMed PMID: 24385896; PubMed Central PMCID: PMC3868511.
5. Segal BH, Herbrecht R, Stevens DA, Ostrosky-Zeichner L, Sobel J, Viscoli C, et al. Defining responses to therapy and study outcomes in clinical trials of invasive fungal diseases: Mycoses Study Group and European Organization for Research and Treatment of Cancer consensus criteria. *Clin Infect Dis*. 2008;47(5):674-83. doi: 10.1086/590566. PubMed PMID: 18637757; PubMed Central PMCID: PMC2671230.
6. Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(1):133-63. doi: 10.1128/CMR.00029-06. PubMed PMID: 17223626; PubMed Central PMCID: PMC1797637.
7. Yapar N. Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis. *Ther Clin Risk Manag*. 2014;10:95-105. doi: 10.2147/TCRM.S40160. PubMed PMID: 24611015; PubMed Central PMCID: PMC3928396.
8. Arendrup MC. Epidemiology of invasive candidiasis. *Curr Opin Crit Care*. 2010;16(5):445-52. doi: 10.1097/MCC.0b013e32833e84d2. PubMed PMID: 20711075.
9. Kobayashi K, Kaneda K, Kasama T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. *Microsc Res Tech*. 2001;53(4):241-5. doi: 10.1002/jemt.1090. PubMed PMID: 11340669.
10. Aoun J, Habib R, Charaffeddine K, Taraif S, Loya A, Khalifeh I. Caseating granulomas in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(10):e3255. doi: 10.1371/journal.pntd.0003255. PubMed PMID: 25340702; PubMed Central PMCID: PMC4207691.
11. Girgis NM, Gundra UM, Ward LN, Cabrera M, Frevert U, Loke P. Ly6C(high) monocytes become alternatively activated macrophages in schistosome granulomas with help from CD4+ cells. *PLoS Pathog*. 2014;10(6):e1004080. doi: 10.1371/journal.ppat.1004080. PubMed PMID: 24967715; PubMed Central PMCID: PMC4072804.

12. Heninger E, Hogan LH, Karman J, Macvilay S, Hill B, Woods JP, et al. Characterization of the *Histoplasma capsulatum*-induced granuloma. *J Immunol.* 2006;177(5):3303-13. PubMed PMID: 16920971; PubMed Central PMCID: PMCPMC2748851.
13. Subbian S, Tsenova L, Kim MJ, Wainwright HC, Visser A, Bandyopadhyay N, et al. Lesion-Specific Immune Response in Granulomas of Patients with Pulmonary Tuberculosis: A Pilot Study. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132249. doi: 10.1371/journal.pone.0132249. PubMed PMID: 26133981; PubMed Central PMCID: PMCPMC4489805.
14. De Luca A, Carvalho A, Cunha C, Iannitti RG, Pitzurra L, Giovannini G, et al. IL-22 and IDO1 affect immunity and tolerance to murine and human vaginal candidiasis. *PLoS Pathog.* 2013;9(7):e1003486. doi: 10.1371/journal.ppat.1003486. PubMed PMID: 23853597; PubMed Central PMCID: PMCPMC3708875.
15. Legrand F, Lecuit M, Dupont B, Bellaton E, Huerre M, Rohrlich PS, et al. Adjuvant corticosteroid therapy for chronic disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis.* 2008;46(5):696-702. doi: 10.1086/527390. PubMed PMID: 18230039.
16. Singh HR, Singh NG, Singh TB. Estimation of CD4+ and CD8+ T-lymphocytes in human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome patients in Manipur. *Indian J Med Microbiol.* 2007;25(2):126-32. PubMed PMID: 17582182.
17. Alvarez-Rueda N, Albassier M, Allain S, Deknuydt F, Altare F, Le Pape P. First human model of in vitro *Candida albicans* persistence within granuloma for the reliable study of host-fungi interactions. *PLoS One.* 2012;7(6):e40185. doi: 10.1371/journal.pone.0040185. PubMed PMID: 22768252; PubMed Central PMCID: PMCPMC3387014.
18. Martinez-Alvarez JA, Perez-Garcia LA, Flores-Carreón A, Mora-Montes HM. The immune response against *Candida* spp. and *Sporothrix schenckii*. *Rev Iberoam Micol.* 2014;31(1):62-6. doi: 10.1016/j.riam.2013.09.015. PubMed PMID: 24252829.
19. Borghi M, De Luca A, Puccetti M, Jaeger M, Mencacci A, Oikonomou V, et al. Pathogenic NLRP3 Inflammasome Activity during *Candida* Infection Is Negatively Regulated by IL-22 via Activation of NLRC4 and IL-1Ra. *Cell Host Microbe.* 2015;18(2):198-209. doi: 10.1016/j.chom.2015.07.004. PubMed PMID: 26269955.
20. Hope W, Natarajan P, Goodwin L. Invasive fungal infections. *Clin Med (Lond).* 2013;13(5):507-10. doi: 10.7861/clinmedicine.13-5-507. PubMed PMID: 24115712.
21. Kim J, Sudbery P. *Candida albicans*, a major human fungal pathogen. *J Microbiol.* 2011;49(2):171-7. doi: 10.1007/s12275-011-1064-7. PubMed PMID: 21538235.
22. Gow NA, van de Veerdonk FL, Brown AJ, Netea MG. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. *Nat Rev Microbiol.* 2012;10(2):112-22. doi: 10.1038/nrmicro2711. PubMed PMID: 22158429; PubMed Central PMCID: PMCPMC3624162.
23. Ghaleb M, Hamad M, Abu-Elteen KH. Vaginal T lymphocyte population kinetics during experimental vaginal candidosis: evidence for a possible role of CD8+ T cells in protection against vaginal candidosis. *Clin Exp Immunol.* 2003;131(1):26-33. PubMed PMID: 12519382; PubMed Central PMCID: PMCPMC1808609.

24. Paulovicova E, Machova E, Tulinska J, Bystricky S. Cell and antibody mediated immunity induced by vaccination with novel *Candida dubliniensis* mannan immunogenic conjugate. *Int Immunopharmacol.* 2007;7(10):1325-33. doi: 10.1016/j.intimp.2007.05.014. PubMed PMID: 17673147.
25. Altare F, Durandy A, Lammas D, Emile JF, Lamhamedi S, Le Deist F, et al. Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency. *Science.* 1998;280(5368):1432-5. PubMed PMID: 9603732.
26. Spellberg B. Novel insights into disseminated candidiasis: pathogenesis research and clinical experience converge. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):e38. doi: 10.1371/journal.ppat.0040038. PubMed PMID: 18282100; PubMed Central PMCID: PMCPMC2242839.
27. Muranski P, Restifo NP. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood.* 2013;121(13):2402-14. doi: 10.1182/blood-2012-09-378653. PubMed PMID: 23325835; PubMed Central PMCID: PMCPMC3612853.
28. Wuthrich M, Filutowicz HI, Warner T, Deepe GS, Jr., Klein BS. Vaccine immunity to pathogenic fungi overcomes the requirement for CD4 help in exogenous antigen presentation to CD8+ T cells: implications for vaccine development in immune-deficient hosts. *J Exp Med.* 2003;197(11):1405-16. doi: 10.1084/jem.20030109. PubMed PMID: 12782709; PubMed Central PMCID: PMCPMC2193905.
29. Ashman RB, Papadimitriou JM, Fulurija A. Acute susceptibility of aged mice to infection with *Candida albicans*. *J Med Microbiol.* 1999;48(12):1095-102. doi: 10.1099/00222615-48-12-1095. PubMed PMID: 10591163.
30. Balish E, Vazquez-Torres FA, Jones-Carson J, Wagner RD, Warner T. Importance of beta2-microglobulin in murine resistance to mucosal and systemic candidiasis. *Infect Immun.* 1996;64(12):5092-7. PubMed PMID: 8945551; PubMed Central PMCID: PMCPMC174493.
31. Zuckermann FA. Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999;72(1-2):55-66. PubMed PMID: 10614493.
32. Sarrabayrouse G, Bossard C, Chauvin J-M, Jarry A, Meurette G, et al. CD4CD8aa Lymphocytes, A Novel Human Regulatory T Cell Subset Induced by Colonic Bacteria and Deficient in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *PLoS Biol* 2014; 12(4): e1001833. doi:10.1371/journal.pbio.1001833

Article n°3

**Mise en évidence d'une variabilité
intra-individuelle de la réponse
granulomateuse à *C. albicans***

Au cours d'une étude précédente, nous avons étudié la formation de granulomes *in vitro* suite à l'infection de cellules immunes de sujets sains immunocompétents par différentes espèces de *Candida*. Ce travail montrait une forte variabilité inter-individuelle aussi bien au niveau de l'aspect et que de l'organisation cellulaire de la réponse granulomateuse mais aussi une variation dans le devenir de l'infection.

Ici, nous avons confirmé cette variabilité inter-individuelle mais aussi observé si une variabilité intra-individuelle de la réponse granulomateuse pouvait être mise en évidence. Pour ce faire, nous avons prélevé des échantillons de sang de 6 sujets volontaires immunocompétents tous les 15 jours et cela sur une période de 3 mois (6 prélèvements par sujets). Pour chaque prélèvement et pour chaque sujet, les cellules immunes périphériques (PBMCs et PNNs) ont été infectées avec 3 isolats cliniques différents de *C. albicans*, et la dynamique de formation du granulome mais aussi la charge fongique et la production de cytokines au sein des structures granulomateuses ont été suivies au cours du temps.

Les résultats obtenus ont mis en évidence la présence d'une variabilité inter et intra-individuelle aussi bien dans l'aspect de la réponse granulomateuse à *C. albicans* (taille et nombre des granulomes) que dans l'issue de l'infection elle-même. En effet, pour 5 sujets on observe une variabilité dans le devenir de l'infection, avec une alternance entre périodes de contrôle de l'infection (clairance de *Candida*) et périodes de persistance du pathogène au sein des structures granulomateuses.

**Mise en évidence d'une variabilité intra-individuelle
de la réponse granulomateuse
à *Candida albicans***

Barbara Misme-Aucouturier, Nidia Alvarez-Rueda, Marjorie Albassier, Patrice Le Pape

Département de Parasitologie et de Mycologie Médicale, Université de Nantes,
Nantes Atlantique Universités,
EA1155 – IICiMed, Institut de Recherche en Santé 2, Nantes, Pays de Loire, France.

Candida albicans est un champignons microscopique saprophyte de l'Homme présent au niveau de la flore commensale de la muqueuse gastro-intestinale, de la flore cutanée et des muqueuses génitale et urinaire, où il vit en équilibre avec la flore bactérienne (Pfaller et Diekema 2007). Bien que *Candida* ait co-évolué au sein de son hôte humain, c'est une relation complexe qui permet à *Candida* de ne pas causer de dégâts à son hôte et pour les individus sains de reconnaître l'agent fongique sans mettre en place une réponse immunitaire (Jabra-Rizk *et al.* 2016). Toutefois, chez les patients immunodéprimés, mais aussi suite à une chimiothérapie prolongée et/ou à des interventions chirurgicales répétées, cette levure commensale peut provoquer des infections fongiques chroniques (Brown *et al.* 2012). Des études ont également montré que ces infections fongiques chroniques pouvaient également survenir chez des patients n'ayant aucune immunodéficience connue (Hoarau *et al.* 2013 ; Bohra *et al.* 2009 ; Akyüz *et al.* 2002). Ces candidoses chroniques sont un problème de santé publique avec une incidence annuelle rapportée à la population internationale évaluée entre 1,5 et 8 pour 100000 personnes et présentant des taux de mortalité variant entre 30 et 50 % (Yapar 2014 ; Arendrup 2010).

Dans ce contexte de candidoses chroniques, une réaction inflammatoire multicellulaire d'hypersensibilité de type IV, communément appelée granulome, peut se mettre en place

lorsque l'agent fongique ne parvient pas à être éliminé (Kontoyiannis *et al.* 2000). Toutefois, il est important de rappeler que le granulome peut être efficace, contrôler l'infection et éliminer le pathogène. D'un autre côté, la réponse granulomateuse mise en place peut également se montrer délétère et permettre la dissémination et persistance de l'infection (Kobayashi *et al.* 2001). Bien que rares, ces manifestations cliniques existent et sont importantes dans la physiopathologie de ces candidoses (Albano *et al.* 2016 ; Hoarau *et al.* 2013 ; Miri *et al.* 2012).

De récentes études menées dans notre laboratoire (Misme-Aucouturier *et al.* 2017, Alvarez-Rueda *et al.* 2012), nous ont permis de confirmer ces données physiopathologiques sur l'issue de l'infection, clairance ou persistance. A l'aide d'un modèle *in vitro* humain de granulome fongique à *Candida*, qui consiste en l'infection par *Candida* spp. de cellules immunes périphériques (PBMCs et PNNs) de sujets sans immunodéficiência apparente, nous avons mis en évidence une variabilité inter-individuelle de la réponse granulomateuse à *Candida*. En effet, pour une même espèce infectante, certains sujets contrôlent l'infection au sein des granulomes et il en résulte une clairance de *Candida*, alors que d'autres présentent des charges fongiques élevées et donc une persistance de l'agent fongique au sein des structures granulomateuses. Cette étude nous permet donc d'avoir « une photographie à un instant T » de ce qu'est la réponse granulomateuse et son devenir.

Dans le but d'évaluer l'existence d'une variabilité intra-individuelle mais aussi afin d'étudier les variations dans le temps de cette « photographie » de la réponse granulomateuse, nous avons prélevé des échantillons de sang chez six sujets volontaires immunocompétents et ce tous les 15 jours sur une période de 3 mois. Nous avons donc obtenu 6 prélèvements par sujets. Pour chaque prélèvement et pour chaque sujet, les cellules immunes périphériques (PBMCs et PNNs) ont été récupérées et ont été infectées avec des blastoconidies de *C. albicans*. La dynamique de formation du granulome, en termes de charge fongique et d'intensité de réponse, mais aussi la production de cytokines ont été suivies au cours du temps.

Matériel et méthodes

Les différents isolats cliniques de *C. albicans* (Caal93, Caal121 et Caal123) proviennent de la mycothèque du Département de Parasitologie et Mycologie Médicale, EA 1155 IICiMed, Université de Nantes. Les souches ont été repiquées sur gélose PDA (Potatoe Dextrose Agar) et incubées une nuit à 30°C. Après un lavage dans du PBS, les blastoconidies

sont resuspendues dans une solution de RPMI 1640 (Sigma) supplémenté avec 8% de sérum humain (SH) à une concentration de 10^6 cellules/ml.

Les échantillons de sang (15 ml) ont été obtenus de 6 sujets féminins sains volontaires (notés S1, S2, S3, S4, S5 et S6). Les cellules immunes (PBMCs et PNNs) ont été obtenues par centrifugation différentielle sur gradient de Ficoll (Polymorphprep™ Proteogenix). Les anneaux correspondant aux PBMCs et PNNs ont été récupérés, ajustés à un volume de 10^6 cellules/ml et incubés dans du milieu RPMI 1640 (Sigma) supplémenté avec 8% de sérum humain (SH)

Les cellules fongiques sont ajoutées à une MOI (Multiplicity of Infection) de 2000 :1 et la co-culture a été incubée à 37°C, 5% de CO₂. La formation de granulomes a été suivie par microscopie optique inversée de façon journalière. La charge fongique au sein des granulomes a été évaluée par rétroculture à 0, 2 4 et 6 jours post-infection. Des cellules non infectées ont été utilisées comme contrôle négatif.

1 ml de surnageant de culture a été récupéré lors de chaque infection expérimentale de chacun des 6 sujets et ce pour chaque isolat clinique ainsi que pour les contrôles aux jours 2, 4 et 6 post-infection. Les échantillons ont été conservés à -80°C. De même pour les sérums de chaque sujet à chaque prélèvement qui correspondent au jour 0. Plusieurs cytokines (IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IL-17F et IL-22) ont été quantifiées à l'aide d'un kit multiplex ProcartaPlex (Affymetrix, eBioscience) sur un système MAGPIX (Luminex) en respectant les instructions du fournisseur. Brièvement, un mélange de billes marquées de fluorochromes permet de mesurer simultanément les niveaux de cytokines dans le surnageant ou le sérum (selon le protocole standard). Les courbes standard de chaque analyte sont générées en utilisant une solution de référence avec des concentrations connues fournie dans le kit. Chaque échantillon est mesuré 2 fois et la concentration de cytokines est calculée à l'aide du logiciel ProcartaPlex Analyst 1.0 (Affymetrix, eBioscience).

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism V7.0a.

Validation du plan expérimental

Tout comme lors des précédentes études (Misme-Aucouturier *et al.* 2017 ; Alvarez *et al.* 2012), deux types de réponse à l'infection ont été mis en évidence : soit une persistance de l'infection avec une augmentation de la charge fongique progressive jusqu'à 6 jours post-infection et une persistance du pathogène dans les structures granulomateuses qualifiée de « persistant-infection » (PI), soit une clairance de *C. albicans* au sein des granulomes avec

une diminution progressive de la charge fongique jusqu'à 6 jours post-infection qualifiée de « controlled-infection » (CI). Afin de valider les résultats obtenus dans cette étude de la variabilité intra-individuelle, certaines des données obtenues ont été comparées avec celles de l'expérimentation précédente (les mêmes isolats cliniques de *C. albicans* avec dix autres donneurs) (Misme-Aucouturier *et al.* 2017).

Tout d'abord, les proportions d'infections expérimentales où il y a persistance (PI) ou clairance (CI) ont été comparées pour les deux expérimentations (**Figure 1**) et il en ressort que les proportions de réponse CI et de PI sont très proches entre les deux expérimentations.

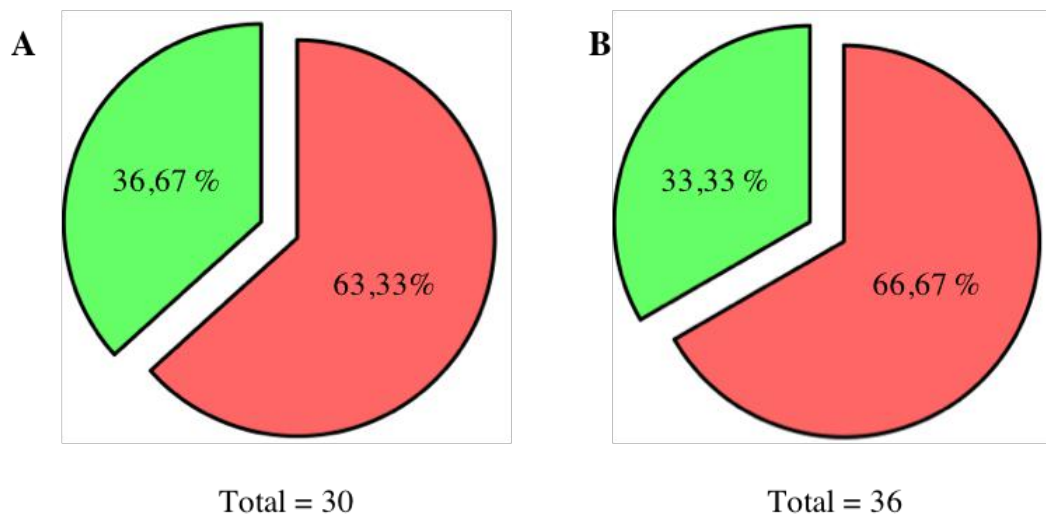


Figure 1 : Variations inter-expérimentales des proportions de CI et PI. Un cutoff a été établi afin de décrire la capacité des cellules immunes à contrôler l'infection ou non à 6 jours post-infection. Les infections expérimentales pour lesquelles la charge fongique au sein des granulomes à 6 jours post-infection est supérieure à 100 CFU/ml sont qualifiées de « controlled-infection » (CI) en rouge. Celles pour lesquelles la charge fongique au sein des granulomes à 6 jours post-infection est inférieure à 100 CFU/ml sont qualifiées de « persistant-infection » (PI) en vert. Les diagrammes représentent les proportions de CI et de PI pour (A) la première étude (Misme-Aucouturier *et al.* 2017) et pour (B) les 6 sujets prélevés à des temps successifs et dont les cellules ont été infectées par *C. albicans* (Caal 93, 121 et 123).

Ensuite, l'évolution de la prolifération des 3 isolats cliniques de *C. albicans* entre les deux expérimentations a été comparée (**Figure 2**). Pour ce faire, la prolifération de *C. albicans* au sein des granulomes a été suivie au cours du temps (à 0, 2, 4 et 6 jours post-infection). L'activité anti-*Candida* des cellules immunes a été évaluée en comptant le nombre de levures viables par rétroculture (CFU : colony forming unit). Il en ressort que l'évolution de la charge fongique de *C. albicans* pour les deux expérimentations ne présente aucune

différence significative. De façon similaire aux précédents travaux, l'évolution de la charge fongique montre un contrôle de la prolifération de *Candida* par les phagocytes durant les deux premiers jours, suivi d'une augmentation constante et progressive de la charge fongique à 6 jours post-infection.

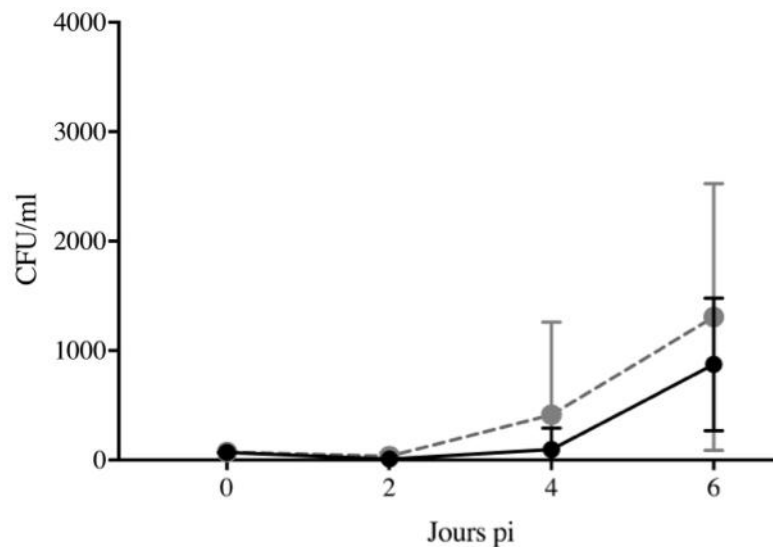


Figure 2 : Comparaison de l'évolution de la prolifération de *C. albicans* au sein des granulomes. La charge fongique a été déterminée à 0, 2, 4 et 6 jours post-infection. La ligne noire représente la moyenne \pm SEM de la charge fongique des granulomes pour tous les prélèvements des 6 sujets testés et pour les 3 isolats cliniques de *C. albicans* de l'étude de la variabilité intra-individuelle. La ligne grise en pointillés représente la moyenne \pm SEM de la charge fongique des granulomes des 10 sujets et pour les 3 isolats cliniques de *C. albicans* obtenus lors de l'étude précédente (Misme-Aucouturier *et al.* 2017). T-Test, $\alpha = 0,05$.

Variabilité inter et intra-individuelle à l'issue de l'infection

Tout comme lors des études antérieures, nous mettons en évidence une forte variabilité inter-individuelle, mais aussi une variabilité intra-individuelle du devenir de l'infection à *C. albicans* (**Tableau 1**). En effet, on peut voir que les 6 sujets étudiés ici présentent une variabilité de la réponse avec un sujet qui ne contrôle jamais l'infection (S6), d'autres qui contrôlent peu (S3 et S5) à moyennement (S2 et S4) et un sujet qui contrôle majoritairement l'infection (S2). De plus, on peut constater que la notion de « controlled-infection » (CI) n'est pas constante dans le temps pour un sujet donné, c'est à dire qu'il existe une variabilité intra-individuelle de l'infection. En effet, à l'exception de S6, on observe une alternance entre périodes de contrôle temporaire de l'infection à *C. albicans* par les granulomes et de persistance du pathogène au sein des structures granulomateuses.

Tableau 1 : Variabilité entre les sujets et les prélèvements

Devenir de l'infection par *C. albicans* à 6 jours post-infection pour chaque sujet et chaque prélèvement. Le rouge correspond aux « persistant-infection » (PI) et le vert aux « controlled-infection » (CI).

Sujets	Prélèvements					
	1	2	3	4	5	6
S1	Vert	Rouge	Rouge	Rouge	Vert	Vert
S2	Vert	Vert	Rouge	Rouge	Vert	Vert
S3	Rouge	Rouge	Rouge	Rouge	Vert	Rouge
S4	Vert	Vert	Rouge	Rouge	Vert	Rouge
S5	Rouge	Rouge	Rouge	Vert	Rouge	Rouge
S6	Rouge	Rouge	Rouge	Rouge	Rouge	Rouge

Variations dans l'intensité de la réponse granulomateuse

Dans notre modèle *in vitro*, lors de l'interaction entre *C. albicans* et les cellules immunes, des structures multicellulaires complexes caractéristiques des granulomes, sont identifiables à partir du 4^{ème} jour post-infection. Tous les isolats cliniques ainsi que tous les sujets testés ont été capables de mettre en place une réponse granulomateuse. Le nombre ainsi que la taille des granulomes formés ont été suivis et mesurés par microscopie optique inversée à 4 et 6 jours post-infection. Nous avons observé une variation significative du nombre des granulomes entre les différents prélèvements de chaque sujet et cela dès 4 jours post-infection (**Figure 3**). Il en est de même en ce qui concerne la taille des structures granulomateuses (données non montrées), qui varie entre chaque prélèvement pour un même sujet. Cela nous permet de mettre en évidence la présence d'une variabilité intra-individuelle dans la dynamique d'organisation et de structure de la réponse granulomateuse face à une infection à *C. albicans*.

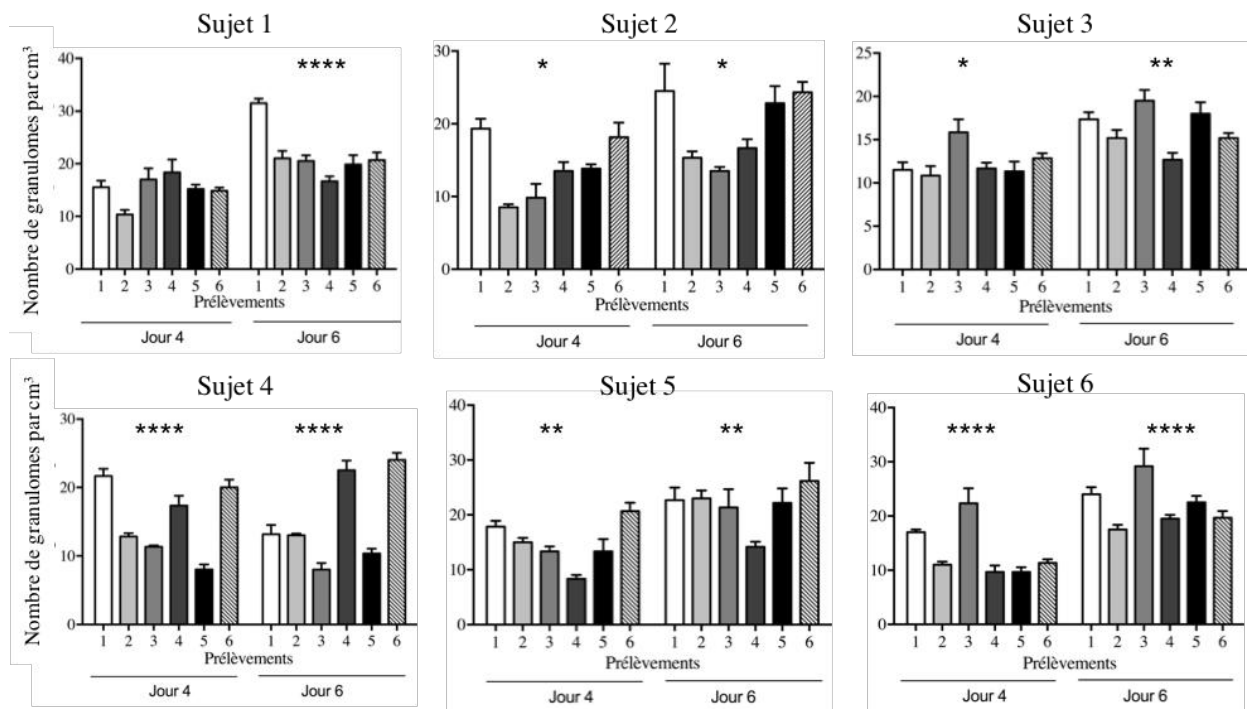


Figure 3 : Variabilité intra-individuelle de l'intensité de la réponse granulomateuse à *C. albicans*. Nombre de granulomes par cm³ à 4 et 6 jours post-infection pour chacun des sujets étudié (S1 à S6). Pour chaque sujet, le nombre de granulomes observés a été rapporté pour chacun des prélèvements (1 à 6). Les barres indiquent le SEM. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$).

Profils cytokiniques des granulomes à *C. albicans*

Les cytokines ont été quantifiées au cours de la formation des structures granulomateuses en récupérant le sérum au jour 0 et les surnageants de culture aux jours 2, 4 et 6 post-infection. La production extracellulaire d'IFN- γ , de TNF- α , d'IL-2, d'IL-4, d'IL-6, d'IL-10, d'IL-17A, d'IL-17F et d'IL-22 a été mesurée. Les surnageants de culture des sujets S2, S3 et S4 lors de l'infection par Caal 123 ont été analysés en raison de l'importante variabilité de la réponse granulomateuse à l'infection par cet isolat clinique. Les profils cytokiniques entre les prélèvements présentant un contrôle de l'infection (CI) et ceux où il y a persistance (PI) ont été comparés pour chacun de 3 sujets (S2, S3 et S4).

Lors de l'analyse conjointe des profils cytokiniques des 3 sujets (**Figure 4**) et de façon assez similaire à nos précédentes observations, il a été observé que les taux d'IL-6 augmentent progressivement entre les jours 2 et 6 post-infection dans les granulomes où l'infection persiste (2,9 pg/ml au jour 2 et 9,6 pg/ml au jour 6). Il en est de même pour le TNF- α dont les taux augmentent significativement au cours du temps (0,6 pg/ml au jour 2 et 7,6 pg/ml au jour 6). Les taux d'IFN- γ quant à eux augmentent tardivement (jour 6 post-infection) dans les

granulome « PI ». Toutefois, contrairement à l'étude précédente, les taux d'IL-10 augmentent au cours du temps également dans les structures granulomateuses où l'infection est contrôlée.

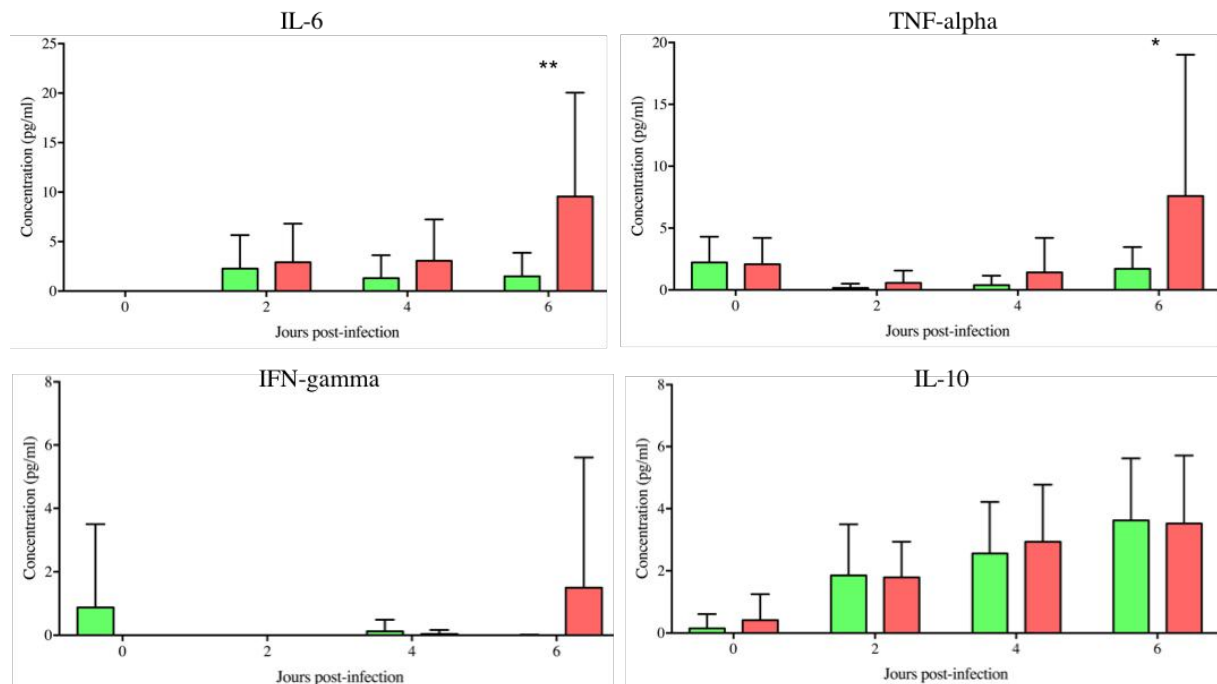


Figure 4 : Profils cytokiniques dans les granulomes « PI » et « CI » au cours du temps. Les taux moyens d'IL-6, de TNF- α , d'IFN- γ et d'IL-10 des 3 sujets analysés (S2,S3,S4) ont été comparés entre les structures granulomateuses contrôlant (CI, en vert) et ne contrôlant pas (PI, en rouge) l'infection par Caal 123. Les barres indiquent le SEM. (ANOVA 2, $\alpha = 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,002$).

Discussion

Ces dernières années, la mise en évidence et la compréhension des interactions multiples et complexes entre *Candida* et son hôte humain ont fait de grands progrès (Jabra-Rizk *et al.* 2016 ; Netea *et al.* 2015 ; Zheng *et al.* 2015). Il est maintenant admis que l'immunité innée ainsi que l'immunité adaptative jouent un rôle dans le contrôle des infections à *Candida*, qui sont quant à elles dépendantes de divers facteurs de virulence (dimorphisme, switch morphologique...) existant chez le pathogène. Toutefois, les variations de réponse mais aussi de devenir de l'infection chez un même individu et les facteurs influençant cette variabilité intra-individuelle ne sont pas connus.

Le but de cette étude a été de confirmer la forte variabilité inter-individuelle mais surtout d'explorer l'existence d'une variabilité intra-individuelle de la réponse à l'infection par *C. albicans* dans notre modèle de granulome fongique humain. L'analyse des données sur

l'évolution de la taille et du nombre de granulomes, mais aussi de la charge fongique ainsi que des profils cytokiniques au cours du temps chez différents sujets, nous ont permis de confirmer forte variabilité inter-individuelle comme observé précédemment (Misme-Aucouturier *et al.* 2017). En ce qui concerne la variabilité intra-individuelle de la réponse granulomateuse à *C. albicans*, lors de l'infection par *Candida* de PBMC et PNN de différents sujets immunocompétents, des variations intra individus de la charge fongique au sein des granulomes conduisant à la clairance ou à la persistance de *Candida*, de la taille mais aussi du nombre des structures granulomateuses ont été observées. En effet, nos observations suggèrent et ce pour la première fois, que la mise en place ainsi que l'efficacité de la réponse granulomateuse peut varier au cours du temps et ce, chez des individus ne présentant aucune immunodépression apparente. Un même sujet peut donc alterner entre des périodes de contrôle de l'infection au sein des granulomes puis, peu de temps après, une réponse granulomateuse inefficace menant à la persistance et à la dissémination de *C. albicans*. La notion de contrôle de l'infection au sein des structures granulomateuse n'est donc pas une constante chez un même individu. Des variations du nombre et de la taille des granulomes ont aussi été mises en évidence chez chaque sujet. Il y a donc, comme on pouvait s'y attendre, une variabilité intra-individuelle dans la dynamique d'organisation et de structure de la réponse granulomateuse à *C. albicans*.

L'analyse des cytokines présentent dans les sérums et surnageants de culture de 3 des sujets ont permis de confirmer les profils cytokiniques de persistance et de clairance de l'infection au sein des granulomes obtenus dans l'étude précédente. En effet, ici nous avons observé une production de cytokines retardée et avec des taux significativement plus élevés de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le TNF- α et l'IFN- γ et un faible rétrocontrôle anti-inflammatoire (IL-10) lors de persistance de l'infection.

Bien qu'une variabilité intra-individuelle ainsi que des variations temporelles de la composition des flores microbiennes soient connues de longue date (Petti *et al.* 1998) mais aussi en ce qui concerne la réponse à des lipopolysaccharides (LPS) bactériens (Holz *et al.* 2015), la variabilité intra-individuelle en réponse à une infection fongique n'est pas une donnée rapportée dans la littérature. Des études ont toutefois mis en évidence une prédisposition aux candidoses vaginales chez les femmes enceintes en raison des modifications hormonales liées à leur grossesse (Sobel 2007). A ce titre, les six volontaires de l'étude étant des femmes, l'inclusion de volontaires, aussi bien masculins que féminins, devra être poursuivie. Il serait également intéressant d'effectuer les prélèvements sur un laps de temps plus important mais aussi d'obtenir pour chaque sujet et à chaque prélèvement un bilan

sanguin général et ainsi qu'un questionnaire approfondi sur l'état général et médical du sujet (traitements médicaux, santé...). Cela permettrait de mettre en évidence ou non des variations de la numération sanguine ou de l'état général du sujet, qui suivant leur nature et l'issue de l'infection expérimentale, permettrait de définir des marqueurs de prédisposition de la persistance ou de la clairance de *Candida* au sein des structures granulomateuses.

Financement

Ce travail est financé par l'Alliance de Recherche sur les Maladies Infectieuses (ARMINA), Région Pays de Loire 2012-2016 et le Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche (France).

Références

- Akyuz, M., G. Karpuzoglu, C. Acikbas, and R. Tuncer. 2002. 'Candida albicans granuloma imitate clivus chordoma', *Acta Neurochir (Wien)*, 144: 505-6.
- Albano, D., G. Bosio, M. Bertoli, G. Petrilli, and F. Bertagna. 2016. 'Hepatosplenic Candidiasis Detected by (18)F-FDG-PET/CT', *Asia Ocean J Nucl Med Biol*, 4: 106-8.
- Alvarez-Rueda, N., M. Albassier, S. Allain, F. Deknuydt, F. Altare, and P. Le Pape. 2012. 'First human model of in vitro Candida albicans persistence within granuloma for the reliable study of host-fungi interactions', *PLoS One*, 7: e40185.
- Arendrup, M.C. 2010. 'Epidemiology of invasive candidiasis', *Curr Opin Crit Care*, 16: 445-52.
- Borha, A., J.J. Parienti, E. Emery, O. Coskun, S. Khouri, and J.M. Derlon. 2009. '[Candida albicans cerebral granuloma in an immunocompetent patient. A case report]', *Neurochirurgie*, 55: 57-62.
- Brown, G.D., D.W. Denning, N.A. Gow, S.M. Levitz, M.G. Netea, and T.C. White. 2012. 'Hidden killers: human fungal infections', *Sci Transl Med*, 4: 165rv13.
- Hoarau, G., O. Kerdraon, M. Lagree, M. Vinchon, N. Francois, F. Dubos, and B. Sendid. 2013. 'Detection of (1,3)-beta-D-glucans in situ in a Candida albicans brain granuloma', *J Infect*, 67: 622-4.
- Holz, O., L. Tan, F. Schaumann, M. Muller, D. Scholl, R. Hidi, A. McLeod, N. Krug and J.M. Hohlfeld. 2015. 'Inter- and intrasubject variability of the inflammatory response to segmental endotoxin challenge in healthy volunteers', *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 35: 50-59.
- Jabra-Rizk, M.A., E.F. Kong, C. Tsui, M.H. Nguyen, C.J. Clancy, P.L. Fidel, Jr., and M. Noverr. 2016. 'Candida albicans Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework', *Infect Immun*, 84: 2724-39.
- Kobayashi, K., K. Kaneda, and T. Kasama. 2001. 'Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity', *Microsc Res Tech*, 53: 241-5.
- Kontoyiannis, D.P., M.A. Luna, B.I. Samuels, and G.P. Bodey. 2000. 'Hepatosplenic candidiasis. A manifestation of chronic disseminated candidiasis', *Infect Dis Clin North Am*, 14: 721-39.
- Miri, S.M., A. Tayebi Meybodi, Z. Habibi, and M. Mohseni. 2012. 'Fungal granuloma of the brain in a case of chronic mucocutaneous candidiasis', *Arch Iran Med*, 15: 452-4.
- Misme-Aucouturier B., M. Albassier, N. Alvarez-Rueda, P. Le Pape. 2017. 'Specific human and Candida cellular interactions lead to controlled or persistent infection outcomes during granuloma-like formation', *Infect Immun* 85:e00807-16. <https://doi.org/10.1128/IAI.00807-16>.
- Netea, M.G., L.A. Joosten, J.W. van der Meer, B.J. Kullberg, and F.L. van de Veerdonk. 2015. 'Immune defence against Candida fungal infections', *Nat Rev Immunol*, 15: 630-42.

- Petti, S., and G. Tarsitani. 1998. 'Intra-individual variations of salivary microbial levels in young adults', *Eur J Oral Sci*, 106: 616-22.
- Pfaller, M.A., and D.J. Diekema. 2007. 'Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem', *Clin Microbiol Rev*, 20: 133-63.
- Sobel, J.D. 2007. 'Vulvovaginal candidosis', *Lancet*, 369: 1961-71.
- Zheng, N.X., Y. Wang, D.D. Hu, L. Yan, and Y.Y. Jiang. 2015. 'The role of pattern recognition receptors in the innate recognition of *Candida albicans*', *Virulence*, 6: 347-61.

Partie III

Conclusion générale et perspectives

Les champignons du genre *Candida* sont des micromycètes saprophytes de l'Homme mais sont aussi considérés comme opportunistes dans des conditions pathologiques sous-jacentes particulières. Le genre *Candida* présente une grande importance médicale du fait de sa prévalence et de sa capacité à provoquer un grand nombre de manifestations cliniques différentes. Ces pathologies, appelées candidoses, peuvent être superficielles et la plupart du temps bénignes, mais aussi profondes et présentant une morbidité et une mortalité élevées (Yapar 2014; Arendrup 2010).

Récemment, le concept de « Damage Response Framework » (DRF) défini dans le cadre des candidoses a permis de mettre en évidence que ces infections sont le résultat de dégâts provoqués par *Candida*, de dégâts provoqués par l'hôte lui-même ou bien les deux simultanément (Jabra-Rizk *et al.* 2016). Il est donc clair que les facteurs de pathogénicité de l'agent fongique interagissent finement avec les différentes cellules immunes humaines et cela au sein même des tissus infectés (Netea *et al.* 2015). De plus, lorsque les réactions immunitaires locales ne sont pas efficaces et/ou défailtantes, cela conduit habituellement à la dissémination de *Candida* provoquant des candidoses invasives mais également des pathologies telles que les candidoses disséminées chroniques (CDC) et les candidoses cutanéomuqueuses chroniques (CMC). Dans ce contexte de candidoses chroniques, une réaction inflammatoire multicellulaire communément appelée granulome, peut se mettre en place en réponse à la présence de l'agent pathogène, réaction qui persiste s'il ne parvient pas à être éliminé. Bien que rares, ces manifestations cliniques existent et sont importantes dans la physiopathologie de ces candidoses. Elles restent toutefois peu étudiées.

Ces dernières années, l'étude des interactions complexes entre *Candida* et son hôte humain a connu d'importants progrès (Romani 2011), notamment par l'observation du rôle de l'immunité innée mais aussi adaptative dans le contrôle des infections à *Candida* (Polke *et al.* 2015; Thompson *et al.* 2011). Toutefois, beaucoup de choses sont inconnues et restent encore à étudier pour permettre la compréhension parfaite de ces interactions. Aussi, le nombre important d'espèces de *Candida* différentes et leurs diverses caractéristiques pathogéniques (« switch » morphologique, adhérence...) mais aussi la diversité des manifestations cliniques et caractéristiques physiopathologiques rend cette tâche difficile. En effet, bien que *C. albicans* soit l'espèce la plus fréquemment retrouvée dans les candidémies, il est à noter l'augmentation de l'incidence des espèces dites non-*albicans* (Tadec *et al.* 2016). Bien que les interactions à court terme de *C. albicans* avec des cellules immunes sont relativement bien étudiées (Dalle *et al.* 2010), celles avec d'autres espèces mais aussi sur des temps d'interaction plus longs ont besoin d'être étudiées (Toth *et al.* 2015).

C'est dans ce contexte que s'est inscrit ce travail de thèse, afin de mieux comprendre la dynamique cellulaire et moléculaire de l'interaction hôte-*Candida* au sein des structures granulomateuses. Une première étude ayant pour but d'observer et de caractériser différentes espèces de *Candida* et leur interaction entre les cellules immunes humaines et ce sur un temps d'observation long (6 jours) a été effectuée. Pour ce faire, nous avons utilisé le modèle *in vitro* humain de granulome fongique à *C. albicans* mis au point par le laboratoire (Alvarez-Rueda *et al.* 2012). Dans notre travail, trente-deux isolats cliniques différents ont été utilisés pour infecter les cellules immunes (PBMCs et PNNs) de dix sujets sains immunocompétents. Une seconde étude a été réalisée afin de caractériser une sous-population cellulaire particulière, les lymphocytes T doubles positifs CD4^{lo}CD8^{hi} dont il s'agit de la première description dans le cadre d'une infection fongique. Enfin, une dernière étude a tenté de définir l'existence d'une variabilité intra-individuelle de la réponse granulomateuse à *C. albicans*.

Parmi les 150 espèces de *Candida* susceptibles d'entraîner une infection invasive (Yapar 2014), notre choix s'est porté sur huit espèces : *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida lusitanae* et *Candida dubliniensis*. En effet, sept d'entre elles font parties des espèces les plus fréquemment isolées en pathologie humaine et ce en basant sur les données épidémiologiques internationales (Chen *et al.* 2014; Guinea 2014; Arendrup 2013; Ortega *et al.* 2011), françaises (Lortholary *et al.* 2014; Lortholary *et al.* 2011) et Nantaises (Tadec *et al.* 2016). En ce qui concerne l'épidémiologie française et européenne, *C. albicans* est l'espèce majoritairement isolée au cours des candidémies (plus de 50% des isolats). Suivent ensuite *C. parapsilosis*, *C. glabrata* et *C. tropicalis*. En ce qui concerne *C. krusei* et *C. kefyr*, d'une étude à l'autre leur fréquence d'isolement s'inverse. *C. dubliniensis* a été choisie de par sa proximité phylogénétique et sa capacité à former de vrais filaments avec *C. albicans*.

Ce travail a mis en évidence que toutes les espèces de *Candida* testées sont capables lorsqu'elles infectent des cellules immunes humaines, d'induire la formation de structures multicellulaires complexes présentant des caractéristiques de granulomes. Toutefois l'interaction est dépendante de l'espèce de *Candida*. Les structures granulomateuses formées au cours de nos expérimentations peuvent être classées d'après leur description histologique, comme des granulomes non nécrosants ressemblant à ceux formés au cours d'infections bactériennes, comme par exemple la tuberculose (Guirado *et al.* 2015; Altare *et al.* 1998). De plus, dans notre modèle, l'observation de ces structures complexes à 6 jours post-infection correspond au délai de mise en place des granulomes à *H. capsulatum* qui sont déjà présents

au niveau du foie et des poumons chez la souris 7 jours post-infection (Heninger *et al.* 2006). A notre connaissance, cette étude est la première montrant que différentes espèces de *Candida* sont capables d'induire la formation de granulomes après une interaction de longue durée avec des cellules humaines. Cette réponse immunitaire locale semble représenter la principale interface entre l'agent fongique et l'hôte et méritait d'être étudiée de façon détaillée, tout comme la relation entre la mise en place du granulome et la physiopathologie des candidoses ~~invasives et chroniques~~. Les micro-abcès sont des structures également observées au cours des infections disséminées à *Candida* et peuvent être décrits comme des foyers de nécrose dispersés et entourés de cellules épithélioïdes, de macrophages et de leucocytes polymorphonucléaires. Toutefois, malgré nos résultats, nous ne pouvons déterminer dans quelle mesure ces micro-abcès peuvent résulter d'infiltrats immunitaires tardifs.

Nous avons également observé que pour toutes les espèces de *Candida* testées ainsi que pour tous les sujets, la charge fongique est contrôlée au cours des deux premiers jours post-infection. Cependant, 6 jours post-infection, des différences significatives apparaissent entre les différentes espèces et 3 groupes distincts ont ainsi été mis en évidence en tenant compte des taux de prolifération fongique et des caractéristiques de la réponse cellulaire de l'hôte. Deux premiers groupes, A (*C. albicans*, *C. dubliniensis* et *C. tropicalis*) et B (*C. lusitaniae*, *C. glabrata* et *C. parapsilosis*) où la multiplication fongique est contrôlée jusqu'au deuxième jour, laquelle est suivie d'une augmentation de la charge fongique entre 4 et 6 jours post-infection. Les taux de prolifération du groupe A sont plus élevés que ceux du groupe B. Un groupe C (*C. krusei* et *C. kefyr*) se caractérisant par un contrôle progressif de la multiplication, puis une clairance du pathogène par les structures granulomateuses. Ces observations concordent avec les études phylogénétiques montrant que *C. albicans*, *C. dubliniensis* et *C. tropicalis* sont des espèces relativement proches et capables toutes les trois de former des hyphes et pseudohyphes (Butler *et al.* 2009). De plus, *C. lusitaniae* et *C. parapsilosis* sont retrouvées dans les tissus infectés sous forme de levures et de pseudohyphes. Étant donné que la capacité à former des hyphes est considérée comme un facteur de virulence pour le genre *Candida*, il semble que celui-ci soit primordial pour la persistance de l'espèce induisant la réaction granulomateuse. Une corrélation positive est aussi observée entre la vitesse de croissance et la capacité à persister des espèces au sein des granulomes mis en place *in vitro*. La réponse immunitaire pourrait alors être dépassée pour certaines espèces.

En se basant sur l'évolution de la charge fongique chez les différents sujets, deux types de réponses ont été mises en évidence par espèce : des individus contrôlant l'infection

qui sont qualifiés de statuts « controlled-infection » (CI) et d'autres ne contrôlant pas l'infection qui sont nommés statuts « persistent-infection » (PI). Dans ce contexte, la caractérisation de la réponse granulomateuse effectuée au niveau cellulaire par cytométrie en flux nous ont permis de comparer la dynamique des interactions cellulaires entre ces statuts « controlled-infection » (CI) et « persistent-infection » (PI). Etant donné que le rôle des cellules phagocytaires a été clairement démontré dans les infections à *Candida*, nous avons commencé par analyser ces populations. En effet, les différentes espèces de *Candida* sont reconnues de manière efficace par les macrophages (Toth *et al.* 2014), et les neutrophiles jouent un rôle essentiel dans l'élimination des levures et des hyphes (Gazendam *et al.* 2014). De plus, nous savons que la neutropénie prolongée et des problèmes fonctionnels des macrophages sont des facteurs de risque de candidoses invasives (Lionakis et Netea 2013). Nos résultats confirment le rôle essentiel des cellules phagocytaires dans les premières étapes de l'interaction et donc l'issue de l'infection *in vitro*. Pour ce qui est des neutrophiles, il semble que des taux de base plus élevés permettent une certaine protection. Leur proportion relative est également plus élevée 2 jours après l'infection chez les sujets contrôlant l'infection (CI). Pour ce qui est de la diminution importante des taux de neutrophiles (CD66+) au cours du temps au sein des granulomes, aussi bien pour les statuts CI que PI, cela pourrait être dû à la mort naturelle des neutrophiles mais aussi à la formation de NETs et la destruction des cellules après avoir éliminé les levures et hyphes de *Candida* (Kenno *et al.* 2016; Urban *et al.* 2006). De plus, l'expérience de déplétion des PNNs dans notre modèle confirme que ces cellules sont non seulement des effecteurs majeurs au cours des infections à *Candida* mais montre qu'ils sont également primordiaux lors de la réponse adaptative contre les pathogènes fongiques.

Les proportions de macrophages (CD14+) ont également été suivies et il apparaît qu'ils restent abondants jusqu'à 4 jours post-infection dans les structures granulomateuses où l'infection est contrôlée (CI) alors qu'ils sont moins nombreux quand l'infection persiste (PI). Le fait que le taux de macrophages diminue au cours du temps a déjà été mis en évidence dans une étude avec des structures granulomateuses à *Histoplasma capsulatum* (Heninger *et al.* 2006). Par ailleurs, il a été montré que la destruction des macrophages par les levures phagocytées de *Candida* spp. est un mécanisme d'évasion qui permet au champignon de se répliquer et de se disséminer (Gazendam *et al.*, 2016). Il ressort donc de nos résultats que les proportions plus importantes de neutrophiles au début de l'infection ainsi que la meilleure résistance des macrophages à *Candida* 4 jours post-infection, correspondent bien à un contrôle de l'infection. Cet argument est également renforcé par le fait que les monocytes

augmentent le recrutement des neutrophiles et jouent donc un rôle crucial dans le contrôle des infections fongiques disséminées (Netea *et al.* 2015).

Afin de compléter la description cellulaire des granulomes formés par les différentes espèces de *Candida*, nous avons également suivi l'évolution de la population de cellules NK dans ces structures. Nos résultats indiquent que les cellules NK jouent un rôle aux stades précoces de l'infection et de la formation des granulomes et qu'elles disparaissent progressivement des structures granulomateuses où l'infection est contrôlée (CI). Cela semble en accord avec les fonctions cytotoxiques des cellules NK (Ramirez-Ortiz et Means 2012) et le fait que ces cellules exercent des fonctions effectrices anti-*Candida* directes mais également qu'elles amorcent l'activité anti-*Candida* des neutrophiles (Voigt *et al.* 2014).

En ce qui concerne les lymphocytes T, ils sont également retrouvés dans les études histologiques de granulomes à *Candida*. Les neutrophiles présentent des antigènes qui permettent l'activation de ces cellules T, ce qui permet un recrutement efficace des lymphocytes T CD4+ qui eux, permettent la mise en place d'une population de lymphocytes T CD8+ optimale (Pahar *et al.* 2006; Sandilands *et al.* 2005). Nos résultats de cytométrie suggèrent que les lymphocytes T CD4+ et CD8+ sont recrutés au sein des granulomes mais cela de façon plutôt tardive (4 jours post-infection) dans les structures contrôlant l'infection (CI). Alors que le taux de CD4+ fluctue faiblement au cours du temps, le pourcentage de T CD8+ diminue progressivement tout comme dans les autres études sur les candidoses invasives où les pourcentages de T CD4+ sont plus élevés que ceux des T CD8+ (Romani *et al.* 1993). De plus, il a été proposé que l'activation des T CD4+ permettrait une protection contre une large variété de mycoses (Naseem *et al.* 2015) mais aussi qu'il existerait un rôle particulier des T CD8+ dans l'élimination de *C. albicans* du foie et du tractus intestinal (Jones-Carson *et al.* 1997). Ce recrutement trop tardif des T CD4+ dans les granulomes où l'infection persiste couplé à d'autres facteurs, pourrait mener à la dissémination fongique. Il est aussi intéressant de voir que le ratio CD4+/CD8+ est plus élevé dans les granulomes contrôlant l'infection (CI), ce qui est dû à la diminution de la proportion de T CD8+.

Ces données indiquent que les granulomes à *Candida* spp. permettent dans certaines conditions le contrôle de l'infection et que la persistance est multifactorielle. De fortes proportions de neutrophiles au début de l'infection, ainsi que l'accumulation de cellules NK et un ratio CD4+/CD8+ élevé sont corrélés à une production précoce d'IFN- γ et à un statut de contrôle de l'infection (CI). La production locale d'INF- γ active les macrophages pour la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) essentielles à l'élimination de *Candida*.

Une production précoce de cytokines comme l'IFN- γ a déjà été observée lors de la clairance de *C. albicans* de la muqueuse orale chez la souris (Ahmad *et al.* 2012). Cependant, les variations de production de cytokines semblent orienter vers un statut de persistance de l'infection. En effet, lors de la persistance de l'infection, la production de cytokines est retardée et est fortement pro-inflammatoire (IL-6, IFN- γ , TNF- α et IL-10). Dans ce cas, la production d'IFN- γ n'est pas optimale et est retardée, suggérant une incapacité de l'hôte à contrôler l'infection. Ceci est également corrélé avec la production faible et retardée de cytokines chez les souris sensibles aux candidoses.

Dans cette première étude, lors de l'analyse cytométrique, une population de lymphocytes T particulière a été observée. En effet, des lymphocytes T doubles positifs CD4⁺CD8⁺ sont recrutés de façon tardive au sein des granulomes à *C. albicans*. Nous nous sommes donc attachés à explorer plus précisément cette sous population cellulaire au cours de la formation du granulome. Nos résultats suggèrent, et ce pour la première fois, que des lymphocytes T CD4^{lo}CD8^{hi} infiltrent les granulomes à *C. albicans* et ce de façon plus importante lorsque l'infection persiste (PI). Toutefois, les fonctions et caractéristiques phénotypiques exactes de cette sous-population au cours des candidoses est inconnue. Quelques expériences ont mis en évidence la présence de doubles positifs CD4⁺CD8⁺ lors de l'infection vaginale de *C. albicans* chez des souris traitées aux œstrogènes (Ghaleb *et al.* 2003) et une augmentation des différentes sous populations doubles positifs CD4⁺CD8⁺ a aussi été observée chez des lapins immunisés avec un conjugué de sérum humain et mannanes de *C. dubliniensis* (Paulovicova *et al.* 2007). Il est intéressant de noter que les taux de cellules T CD4^{lo}CD8^{hi} augmentent chez les patients avec des infections virales chroniques, des maladies auto-immunes et des cancers (Martinez-Gallo *et al.* 2008). Cette augmentation des proportions de lymphocytes T CD4^{lo}CD8^{hi} dans les granulomes où l'infection persiste (PI) est également observée pour les autres espèces du groupe A : *C. dubliniensis* et *C. tropicalis*, mais dans de moindres mesures.

La dernière étude réalisée porte sur la possibilité d'une variabilité intra-individuelle à l'infection par *C. albicans*. En effet, lors de l'analyse des résultats des dix sujets sains, une forte variabilité inter-individuelle de la réponse granulomateuse en matière de taille et nombre de granulomes mais aussi en ce qui concerne l'évolution de la réponse granulomateuse avait été observée. Nous avons donc voulu savoir si une variabilité intra-individuelle pouvait être également observée. Pour ce faire, des échantillons de sang ont été prélevés chez six sujets volontaires immunocompétents et ce tous les 15 jours sur une période de 3 mois (six

prélèvements par sujet). L'infection des cellules immunes (PBMCs et PNNs) par *C. albicans*, a mis en évidence une variation de la réponse granulomateuse à *C. albicans* (taille et nombre des granulomes) ainsi qu'une variabilité de l'issue de l'infection elle-même. Pour 5 des sujets, une alternance entre périodes de contrôle de l'infection par les granulomes et de persistance de *C. albicans* au sein des structures granulomateuses a été observée. La notion de contrôle ou de persistance de *Candida* au sein des granulomes n'est donc pas une constante propre à chaque individu.

Bien qu'une variabilité intra-individuelle dans la composition des flores microbiennes soit connue (Petti et Tarsitani 1998) mais aussi en ce qui concerne la réponse à des lipopolysaccharides (LPS) bactériens, la variabilité intra-individuelle en réponse à une infection fongique n'est pas une donnée rapportée dans la littérature. Des études ont mis en évidence une prédisposition aux candidoses vaginales chez les femmes enceintes et ce notamment en raison des modifications hormonales liées à leur grossesse (Sobel 2007). Différentes modalités, comme par exemple celles affectant l'état général du sujet (fatigue, alimentation, activité physique, affection intercurrente...) lors du prélèvement mais aussi des caractéristiques biochimiques et physiologiques (infection, variation de la numération sanguine...) pourraient avoir un effet sur la réponse individuelle face aux infections à *Candida*.

L'ensemble de ce travail indique que les structures granulomateuses formées par les différentes espèces de *Candida* soient en accord avec la physiopathologie des candidoses chroniques dans lesquelles ces structures sont rencontrées. Ces études ouvrent de nombreuses perspectives pour lesquelles la détermination exacte des fonctions de la sous-population régulatrice de T doubles positifs et de leur rôle dans le granulome semble nécessaire. Le modèle devrait également permettre d'analyser les déterminants de la paroi de *Candida* dans le devenir de la réaction granulomateuse. Une analyse des différentes populations cellulaires ainsi que de la réponse cytokinique entre les granulomes contrôlant l'infection et ceux ne la contrôlant pas chez un même individu pourrait également renseigner sur les déterminants cellulaires permettant la clairance de *Candida* par les structures granulomateuses et la résolution de l'infection. Enfin, ce modèle pourrait également être utilisé pour observer l'action des antifongiques existants sur les levures et hyphes présents dans les granulomes mais également afin de mettre en place de nouvelles stratégies de libération des molécules antifongiques.

Références bibliographiques

- Abe, F., K. Usui, and T. Hiraki. 2009. 'Fluconazole modulates membrane rigidity, heterogeneity, and water penetration into the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*', *Biochemistry*, 48: 8494-504.
- Abi-Said, D., E. Anaissie, O. Uzun, I. Raad, H. Pinzcowski, and S. Vartivarian. 1997. 'The epidemiology of hematogenous candidiasis caused by different *Candida* species', *Clin Infect Dis*, 24: 1122-8.
- Achkar, J.M., and B.C. Fries. 2010. 'Candida infections of the genitourinary tract', *Clin Microbiol Rev*, 23: 253-73.
- Adams, D.O. 1976. 'The granulomatous inflammatory response. A review', *Am J Pathol*, 84: 164-92.
- Ahmad, E., M.T. Fatima, M. Saleemuddin, and M. Owais. 2012. 'Plasma beads loaded with *Candida albicans* cytosolic proteins impart protection against the fungal infection in BALB/c mice', *Vaccine*, 30: 6851-8.
- Akyuz, M., G. Karpuzoglu, C. Acikbas, and R. Tuncer. 2002. 'Candida albicans granuloma imitate clivus chordoma', *Acta Neurochir (Wien)*, 144: 505-6.
- Albano, D., G. Bosio, M. Bertoli, G. Petrilli, and F. Bertagna. 2016. 'Hepatosplenic Candidiasis Detected by (18)F-FDG-PET/CT', *Asia Ocean J Nucl Med Biol*, 4: 106-8.
- Albuquerque, P., and A. Casadevall. 2012. 'Quorum sensing in fungi--a review', *Med Mycol*, 50: 337-45.
- Alcoba-Florez, J., S. Mendez-Alvarez, J. Cano, J. Guarro, E. Perez-Roth, and M. del Pilar Arevalo. 2005. 'Phenotypic and molecular characterization of *Candida nivariensis* sp. nov., a possible new opportunistic fungus', *J Clin Microbiol*, 43: 4107-11.
- Alem, M.A., M.D. Oteef, T.H. Flowers, and L.J. Douglas. 2006. 'Production of tyrosol by *Candida albicans* biofilms and its role in quorum sensing and biofilm development', *Eukaryot Cell*, 5: 1770-9.
- Algarra, I., E. Ortega, M.J. Serrano, G. Alvarez de Cienfuegos, and J.J. Gaforio. 2002. 'Suppression of splenic macrophage *Candida albicans* phagocytosis following in vivo depletion of natural killer cells in immunocompetent BALB/c mice and T-cell-deficient nude mice', *FEMS Immunol Med Microbiol*, 33: 159-63.
- Algood, H.M., J. Chan, and J.L. Flynn. 2003. 'Chemokines and tuberculosis', *Cytokine Growth Factor Rev*, 14: 467-77.
- Allendoerfer, R., and G.S. Deepe, Jr. 1998. 'Blockade of endogenous TNF-alpha exacerbates primary and secondary pulmonary histoplasmosis by differential mechanisms', *J Immunol*, 160: 6072-82.
- Alp, S., S. Arikan-Akdagli, D. Gulmez, S. Asciglu, O. Uzun, and M. Akova. 2015. 'Epidemiology of candidaemia in a tertiary care university hospital: 10-year experience with 381 candidaemia episodes between 2001 and 2010', *Mycoses*, 58: 498-505.
- Altare, F., A. Durandy, D. Lammas, J.F. Emile, S. Lamhamedi, et al. 1998. 'Impairment of mycobacterial immunity in human interleukin-12 receptor deficiency', *Science*, 280: 1432-5.
- Altmeier, S., A. Toska, F. Sparber, A. Teijeira, C. Halin, and S. LeibundGut-Landmann. 2016. 'IL-1 Coordinates the Neutrophil Response to *C. albicans* in the Oral Mucosa', *PLoS Pathog*, 12: e1005882.

- Alvarez-Rueda, N., M. Albassier, S. Allain, F. Deknuydt, F. Altare, and P. Le Pape. 2012. 'First human model of in vitro *Candida albicans* persistence within granuloma for the reliable study of host-fungi interactions', *PLoS One*, 7: e40185.
- Alzahrani, Y.A., H.A. Aziz, N.K. Shrestha, C.V. Biscotti, and A.D. Singh. 2016. 'Cryptococcal iridociliary granuloma', *Surv Ophthalmol*, 61: 498-501.
- Amulic, B., C. Cazalet, G.L. Hayes, K.D. Metzler, and A. Zychlinsky. 2012. 'Neutrophil function: from mechanisms to disease', *Annu Rev Immunol*, 30: 459-89.
- Andes, D.R., N. Safdar, J.W. Baddley, B. Alexander, L. Brumble, et al. 2016. 'The epidemiology and outcomes of invasive *Candida* infections among organ transplant recipients in the United States: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET)', *Transpl Infect Dis*, 18: 921-31.
- ANOFEL. 2013. *Parasitoses et mycoses des régions tempérées et tropicales*.
- Aoun, J., R. Habib, K. Charaffeddine, S. Taraif, A. Loya, and I. Khalifeh. 2014. 'Caseating granulomas in cutaneous leishmaniasis', *PLoS Negl Trop Dis*, 8: e3255.
- Aratani, Y., H. Koyama, S. Nyui, K. Suzuki, F. Kura, and N. Maeda. 1999. 'Severe impairment in early host defense against *Candida albicans* in mice deficient in myeloperoxidase', *Infect Immun*, 67: 1828-36.
- Aratani, Y., F. Kura, H. Watanabe, H. Akagawa, Y. Takano, et al. 2002. 'Relative contributions of myeloperoxidase and NADPH-oxidase to the early host defense against pulmonary infections with *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*', *Med Mycol*, 40: 557-63.
- Arendrup, M.C. 2010. 'Epidemiology of invasive candidiasis', *Curr Opin Crit Care*, 16: 445-52.
- Arendrup, M.C. 2013. 'Candida and candidaemia. Susceptibility and epidemiology', *Dan Med J*, 60: B4698.
- Arendrup, M.C., M. Cuenca-Estrella, C. Lass-Flörl, and W.W. Hope. 2013. 'Breakpoints for antifungal agents: an update from EUCAST focussing on echinocandins against *Candida* spp. and triazoles against *Aspergillus* spp', *Drug Resist Updat*, 16: 81-95.
- Balish, E., T. Warner, C.J. Pierson, D.M. Bock, and R.D. Wagner. 2001. 'Oroesophageal candidiasis is lethal for transgenic mice with combined natural killer and T-cell defects', *Med Mycol*, 39: 261-8.
- Bar, E., A. Gladiator, S. Bastidas, B. Roschitzki, H. Acha-Orbea, A. Oxenius, and S. LeibundGut-Landmann. 2012. 'A novel Th cell epitope of *Candida albicans* mediates protection from fungal infection', *J Immunol*, 188: 5636-43.
- Bar, E., P.G. Whitney, K. Moor, C. Reis e Sousa, and S. LeibundGut-Landmann. 2014. 'IL-17 regulates systemic fungal immunity by controlling the functional competence of NK cells', *Immunity*, 40: 117-27.
- Bassetti, M., M. Merelli, E. Righi, A. Diaz-Martin, E.M. Rosello, et al. 2013. 'Epidemiology, species distribution, antifungal susceptibility, and outcome of candidemia across five sites in Italy and Spain', *J Clin Microbiol*, 51: 4167-72.
- Bayram, C., A. Fettah, N. Yarali, A. Kara, F.M. Azik, B. Tavail, and B. Tunc. 2012. 'Adjuvant corticosteroid therapy in hepatosplenic candidiasis-related iris', *Mediterr J Hematol Infect Dis*, 4: e2012018.
- Becker, K.L., D.C. Ifrim, J. Quintin, M.G. Netea, and F.L. van de Veerdonk. 2015. 'Antifungal innate immunity: recognition and inflammatory networks', *Semin Immunopathol*, 37: 107-16.
- Beno, D.W., A.G. Stover, and H.L. Mathews. 1995. 'Growth inhibition of *Candida albicans* hyphae by CD8+ lymphocytes', *J Immunol*, 154: 5273-81.

- Berman, J., and P.E. Sudbery. 2002. 'Candida Albicans: a molecular revolution built on lessons from budding yeast', *Nat Rev Genet*, 3: 918-30.
- Bernut, A., G. Lutfalla, and L. Kremer. 2015. '[Looking through zebrafish to study host-pathogen interactions]', *Med Sci (Paris)*, 31: 638-46.
- Bhavanam, S., G.R. Rayat, M. Keelan, D. Kunimoto, and S.J. Drews. 2016. 'Understanding the pathophysiology of the human TB lung granuloma using in vitro granuloma models', *Future Microbiol*, 11: 1073-89.
- Bitar, D., O. Lortholary, F. Dromer, B. Coignard, and D. Che. 2013. 'Invasive fungal infections in hospital discharge data, metropolitan France, 2001-2010: incidence, lethality and trends', *Bulletin épidémiologique hebdomadaire*, 12-13: 109-15.
- Blankenship, J.R., and A.P. Mitchell. 2006. 'How to build a biofilm: a fungal perspective', *Curr Opin Microbiol*, 9: 588-94.
- Bonfante, P., and A. Genre. 2010. 'Mechanisms underlying beneficial plant-fungus interactions in mycorrhizal symbiosis', *Nat Commun*, 1: 48.
- Bonhomme, J., and C. d'Enfert. 2013. 'Candida albicans biofilms: building a heterogeneous, drug-tolerant environment', *Curr Opin Microbiol*, 16: 398-403.
- Bonifazi, P., T. Zelante, C. D'Angelo, A. De Luca, S. Moretti, et al. 2009. 'Balancing inflammation and tolerance in vivo through dendritic cells by the commensal Candida albicans', *Mucosal Immunol*, 2: 362-74.
- Borha, A., J.J. Parienti, E. Emery, O. Coskun, S. Khouri, and J.M. Derlon. 2009. '[Candida albicans cerebral granuloma in an immunocompetent patient. A case report]', *Neurochirurgie*, 55: 57-62.
- Bouchara. 2010. *Les levures et levuroses*.
- Bougnoux, M.-E., C. Angebault, J. Leto, and J.-L. Beretti. 2013. 'Identification des levures par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF', *Revue Francophone des Laboratoires*, 2013: 63-69.
- Bougnoux, M.-E., and F. Espinasse. 2003. 'Nouvelles applications des techniques de biologie moléculaire en mycologie médicale', *Revue Française des Laboratoires*, 2003: 67-71.
- Bourgeois, C., O. Majer, I.E. Frohner, I. Lesiak-Markowicz, K.S. Hildering, et al. 2011. 'Conventional dendritic cells mount a type I IFN response against Candida spp. requiring novel phagosomal TLR7-mediated IFN-beta signaling', *J Immunol*, 186: 3104-12.
- Brand, A., and N.A. Gow. 2009. 'Mechanisms of hypha orientation of fungi', *Curr Opin Microbiol*, 12: 350-7.
- Brandes, S., S. Dietrich, K. Hunniger, O. Kurzai, and M.T. Figge. 2017. 'Migration and interaction tracking for quantitative analysis of phagocyte-pathogen confrontation assays', *Med Image Anal*, 36: 172-83.
- Braun, B.R., W.S. Head, M.X. Wang, and A.D. Johnson. 2000. 'Identification and characterization of TUP1-regulated genes in Candida albicans', *Genetics*, 156: 31-44.
- Break, T.J., M. Jaeger, N.V. Solis, S.G. Filler, C.A. Rodriguez, et al. 2015. 'CX3CR1 is dispensable for control of mucosal Candida albicans infections in mice and humans', *Infect Immun*, 83: 958-65.
- Brena, S., J. Cabezas-Olcoz, M.D. Moragues, I. Fernandez de Larrinoa, A. Dominguez, G. Quindos, and J. Ponton. 2011. 'Fungicidal monoclonal antibody C7 interferes with iron acquisition in Candida albicans', *Antimicrob Agents Chemother*, 55: 3156-63.

- Brenchley, J.M., M. Paiardini, K.S. Knox, A.I. Asher, B. Cervasi, et al. 2008. 'Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections', *Blood*, 112: 2826-35.
- Brinkmann, V., and A. Zychlinsky. 2012. 'Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin?', *J Cell Biol*, 198: 773-83.
- Brooks, E.G., G.R. Klimpel, S.E. Vaidya, S.E. Keeney, S. Raimer, A.S. Goldman, and F.C. Schmalstieg. 1994. 'Thymic hypoplasia and T-cell deficiency in ectodermal dysplasia: case report and review of the literature', *Clin Immunol Immunopathol*, 71: 44-52.
- Brown, A.J., G.D. Brown, M.G. Netea, and N.A. Gow. 2014a. 'Metabolism impacts upon Candida immunogenicity and pathogenicity at multiple levels', *Trends Microbiol*, 22: 614-22.
- Brown, A.J., S. Budge, D. Kaloriti, A. Tillmann, M.D. Jacobsen, et al. 2014b. 'Stress adaptation in a pathogenic fungus', *J Exp Biol*, 217: 144-55.
- Brown, A.J., K. Haynes, and J. Quinn. 2009. 'Nitrosative and oxidative stress responses in fungal pathogenicity', *Curr Opin Microbiol*, 12: 384-91.
- Brown, G.D. 2011. 'Innate antifungal immunity: the key role of phagocytes', *Annu Rev Immunol*, 29: 1-21.
- Brown, G.D., D.W. Denning, N.A. Gow, S.M. Levitz, M.G. Netea, and T.C. White. 2012. 'Hidden killers: human fungal infections', *Sci Transl Med*, 4: 165rv13.
- Burgert, S.J., D.C. Classen, J.P. Burke, and D.D. Blatter. 1995. 'Candidal brain abscess associated with vascular invasion: a devastating complication of vascular catheter-related candidemia', *Clin Infect Dis*, 21: 202-5.
- Butler, G., M.D. Rasmussen, M.F. Lin, M.A. Santos, S. Sakthikumar, et al. 2009. 'Evolution of pathogenicity and sexual reproduction in eight Candida genomes', *Nature*, 459: 657-62.
- Byrd, A.S., X.M. O'Brien, C.M. Johnson, L.M. Lavigne, and J.S. Reichner. 2013. 'An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to Candida albicans', *J Immunol*, 190: 4136-48.
- Cabib, E., V. Farkas, O. Kosik, N. Blanco, J. Arroyo, and P. McPhie. 2008. 'Assembly of the yeast cell wall. Crh1p and Crh2p act as transglycosylases in vivo and in vitro', *J Biol Chem*, 283: 29859-72.
- Cambi, A., M.G. Netea, H.M. Mora-Montes, N.A. Gow, S.V. Hato, et al. 2008. 'Dendritic cell interaction with Candida albicans critically depends on N-linked mannan', *J Biol Chem*, 283: 20590-9.
- Casadevall, A. 1995. 'Antibody immunity and invasive fungal infections', *Infect Immun*, 63: 4211-8.
- Casadevall, A., and L.A. Pirofski. 1999. 'Host-pathogen interactions: redefining the basic concepts of virulence and pathogenicity', *Infect Immun*, 67: 3703-13.
- Casadevall, A., and L.A. Pirofski. 2007. 'Antibody-mediated protection through cross-reactivity introduces a fungal heresy into immunological dogma', *Infect Immun*, 75: 5074-8.
- Casadevall, A., and L.A. Pirofski. 2011. 'A new synthesis for antibody-mediated immunity', *Nat Immunol*, 13: 21-8.
- Casadevall, A., and L.A. Pirofski. 2012. 'Immunoglobulins in defense, pathogenesis, and therapy of fungal diseases', *Cell Host Microbe*, 11: 447-56.
- Casqueiro, J., J. Casqueiro, and C. Alves. 2012. 'Infections in patients with diabetes mellitus: A review of pathogenesis', *Indian J Endocrinol Metab*, 16 Suppl 1: S27-36.

- Cassone, A., and R. Cauda. 2012. 'Candida and candidiasis in HIV-infected patients: where commensalism, opportunistic behavior and frank pathogenicity lose their borders', *AIDS*, 26: 1457-72.
- Chakravarty, S.D., G. Zhu, M.C. Tsai, V.P. Mohan, S. Marino, et al. 2008. 'Tumor necrosis factor blockade in chronic murine tuberculosis enhances granulomatous inflammation and disorganizes granulomas in the lungs', *Infect Immun*, 76: 916-26.
- Chandra, J., D.M. Kuhn, P.K. Mukherjee, L.L. Hoyer, T. McCormick, and M.A. Ghannoum. 2001. 'Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans*: development, architecture, and drug resistance', *J Bacteriol*, 183: 5385-94.
- Chapman, S.W., J.D. Cleary, and P.D. Rogers. 2011. 'Amphotericin B.' in C.A. Kauffman, P.G. Pappas, J.D. Sobel and W.E. Dismukes (eds.), *Essentials in Clinical Mycology*.
- Chen, H., M. Fujita, Q. Feng, J. Clardy, and G.R. Fink. 2004. 'Tyrosol is a quorum-sensing molecule in *Candida albicans*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 5048-52.
- Chen, P.Y., Y.C. Chuang, J.T. Wang, W.H. Sheng, C.J. Yu, et al. 2014. 'Comparison of epidemiology and treatment outcome of patients with candidemia at a teaching hospital in Northern Taiwan, in 2002 and 2010', *J Microbiol Immunol Infect*, 47: 95-103.
- Chen, S.C., M.A. Slavin, and T.C. Sorrell. 2011a. 'Echinocandin antifungal drugs in fungal infections: a comparison', *Drugs*, 71: 11-41.
- Chen, Y.L., A. Brand, E.L. Morrison, F.G. Silao, U.G. Bigol, et al. 2011b. 'Calcineurin controls drug tolerance, hyphal growth, and virulence in *Candida dubliniensis*', *Eukaryot Cell*, 10: 803-19.
- Cheng, S., C.J. Clancy, D.J. Hartman, B. Hao, and M.H. Nguyen. 2014. '*Candida glabrata* intra-abdominal candidiasis is characterized by persistence within the peritoneal cavity and abscesses', *Infect Immun*, 82: 3015-22.
- Clemons, K.V., W.C. Darbonne, J.T. Curnutte, R.A. Sobel, and D.A. Stevens. 2000. 'Experimental histoplasmosis in mice treated with anti-murine interferon-gamma antibody and in interferon-gamma gene knockout mice', *Microbes Infect*, 2: 997-1001.
- Cohen-Wolkowicz, M., P.B. Smith, B. Mangum, W.J. Steinbach, B.D. Alexander, et al. 2007. 'Neonatal *Candida* meningitis: significance of cerebrospinal fluid parameters and blood cultures', *J Perinatol*, 27: 97-100.
- Combes, C. 2010. *L'art d'être parasite : les associations du vivant*.
- Concia, E., A.M. Azzini, and M. Conti. 2009. 'Epidemiology, incidence and risk factors for invasive candidiasis in high-risk patients', *Drugs*, 69 Suppl 1: 5-14.
- Conti, H.R., A.R. Huppler, N. Whibley, and S.L. Gaffen. 2014. 'Animal models for candidiasis', *Curr Protoc Immunol*, 105: 19 6 1-17.
- Conti, H.R., F. Shen, N. Nayyar, E. Stocum, J.N. Sun, et al. 2009. 'Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis', *J Exp Med*, 206: 299-311.
- Coronado-Castellote, L., and Y. Jimenez-Soriano. 2013. 'Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis', *J Clin Exp Dent*, 5: e279-86.
- Correia, A., P. Sampaio, S. James, and C. Pais. 2006. '*Candida bracarensis* sp. nov., a novel anamorphic yeast species phenotypically similar to *Candida glabrata*', *Int J Syst Evol Microbiol*, 56: 313-7.
- Coste, A., V. Turner, F. Ischer, J. Morschhauser, A. Forche, et al. 2006. 'A mutation in *Tac1p*, a transcription factor regulating *CDR1* and *CDR2*, is coupled with loss of

- heterozygosity at chromosome 5 to mediate antifungal resistance in *Candida albicans*', *Genetics*, 172: 2139-56.
- Cuenca-Estrella, M., A. Gomez-Lopez, G. Isla, D. Rodriguez, B. Almirante, et al. 2011. 'Prevalence of *Candida bracarensis* and *Candida nivariensis* in a Spanish collection of yeasts: comparison of results from a reference centre and from a population-based surveillance study of candidemia', *Med Mycol*, 49: 525-9.
- d'Ostiani, C., G. Del Soro, A. Bacci, C. Montagnoli, A. Spreca, et al. 2000. 'Dendritic Cells Discriminate between Yeasts and Hyphae of the Fungus *Candida albicans*: Implications for Initiation of T Helper Cell Immunity In Vitro and In Vivo', *J. Exp. Med.*, 191: 1661-73.
- Dalle, F., B. Wachtler, C. L'Ollivier, G. Holland, N. Bannert, et al. 2010. 'Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes', *Cell Microbiol*, 12: 248-71.
- Datry, A., and E. Bart-Delabesse. 2006. '[Caspofungin: mode of action and therapeutic applications]', *Rev Med Interne*, 27: 32-9.
- De Castro, N., E. Mazoyer, R. Porcher, E. Raffoux, F. Suarez, et al. 2012. 'Hepatosplenic candidiasis in the era of new antifungal drugs: a study in Paris 2000-2007', *Clin Microbiol Infect*, 18: E185-7.
- de Groot, P.W., O. Bader, A.D. de Boer, M. Weig, and N. Chauhan. 2013. 'Adhesins in human fungal pathogens: glue with plenty of stick', *Eukaryot Cell*, 12: 470-81.
- de Repentigny, L., D. Lewandowski, and P. Jolicoeur. 2004. 'Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection', *Clin Microbiol Rev*, 17: 729-59, table of contents.
- de Vasconcellos, A.A., L.M. Goncalves, A.A. Del Bel Cury, and W.J. da Silva. 2014. 'Environmental pH influences *Candida albicans* biofilms regarding its structure, virulence and susceptibility to fluconazole', *Microb Pathog*, 69-70: 39-44.
- Decken, K., G. Kohler, K. Palmer-Lehmann, A. Wunderlin, F. Mattner, et al. 1998. 'Interleukin-12 is essential for a protective Th1 response in mice infected with *Cryptococcus neoformans*', *Infect Immun*, 66: 4994-5000.
- Deepe, G.S., Jr. 2005. 'Modulation of infection with *Histoplasma capsulatum* by inhibition of tumor necrosis factor-alpha activity', *Clin Infect Dis*, 41 Suppl 3: S204-7.
- del Fresno, C., D. Soulat, S. Roth, K. Blazek, I. Udalova, et al. 2013. 'Interferon-beta production via Dectin-1-Syk-IRF5 signaling in dendritic cells is crucial for immunity to *C. albicans*', *Immunity*, 38: 1176-86.
- Dementhon, K., S. El-Kirat-Chatel, and T. Noel. 2012. 'Development of an in vitro model for the multi-parametric quantification of the cellular interactions between *Candida* yeasts and phagocytes', *PLoS One*, 7: e32621.
- Denning, D.W. 2003. 'Echinocandin antifungal drugs', *Lancet*, 362: 1142-51.
- Desai, J.V., and A.P. Mitchell. 2015. '*Candida albicans* Biofilm Development and Its Genetic Control', *Microbiol Spectr*, 3.
- Devillers, A., F. Courjol, C. Fradin, A. Coste, D. Poulain, et al. 2013. 'Deficient beta-mannosylation of *Candida albicans* phospholipomannan affects the proinflammatory response in macrophages', *PLoS One*, 8: e84771.
- Dias, M.F., M.V. Quaresma-Santos, F. Bernardes-Filho, A.G. Amorim, R.C. Schechtman, and D.R. Azulay. 2013. 'Update on therapy for superficial mycoses: review article part I', *An Bras Dermatol*, 88: 764-74.
- Djeu, J.Y., D.K. Blanchard, D. Halkias, and H. Friedman. 1986. 'Growth inhibition of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils: activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor', *J Immunol*, 137: 2980-4.

- Djeu, J.Y., D.K. Blanchard, A.L. Richards, and H. Friedman. 1988. 'Tumor necrosis factor induction by *Candida albicans* from human natural killer cells and monocytes', *J Immunol*, 141: 4047-52.
- Dongari-Bagtzoglou, A., and P.L. Fidel, Jr. 2005. 'The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis', *J Dent Res*, 84: 966-77.
- Dos Santos, A.L. 2010. 'HIV aspartyl protease inhibitors as promising compounds against *Candida albicans* Andre Luis Souza dos Santos', *World J Biol Chem*, 1: 21-30.
- Douglas, L.J. 2003. 'Candida biofilms and their role in infection', *Trends Microbiol*, 11: 30-6.
- Dubey, A., R.V. Patwardhan, S. Sampth, V. Santosh, S. Kolluri, and A. Nanda. 2005. 'Intracranial fungal granuloma: analysis of 40 patients and review of the literature', *Surg Neurol*, 63: 254-60; discussion 60.
- Duggan, S., F. Essig, K. Hunniger, Z. Mokhtari, L. Bauer, et al. 2015a. 'Neutrophil activation by *Candida glabrata* but not *Candida albicans* promotes fungal uptake by monocytes', *Cell Microbiol*, 17: 1259-76.
- Duggan, S., I. Leonhardt, K. Hunniger, and O. Kurzai. 2015b. 'Host response to *Candida albicans* bloodstream infection and sepsis', *Virulence*, 6: 316-26.
- Endo, D., K. Fujimoto, R. Hirose, H. Yamanaka, M. Homme, et al. 2017. 'Genetic Phagocyte NADPH Oxidase Deficiency Enhances Nonviable *Candida albicans*-Induced Inflammation in Mouse Lungs', *Inflammation*, 40: 123-35.
- Ene, I.V., and R.J. Bennett. 2009. 'Hwp1 and related adhesins contribute to both mating and biofilm formation in *Candida albicans*', *Eukaryot Cell*, 8: 1909-13.
- Engwerda, C.R., and P.M. Kaye. 2000. 'Organ-specific immune responses associated with infectious disease', *Immunol Today*, 21: 73-8.
- Ermert, D., M.J. Niemiec, M. Rohm, A. Glenthoj, N. Borregaard, and C.F. Urban. 2013. '*Candida albicans* escapes from mouse neutrophils', *J Leukoc Biol*, 94: 223-36.
- Fallon, P.G., P. Smith, and D.W. Dunne. 1998. 'Type 1 and type 2 cytokine-producing mouse CD4+ and CD8+ T cells in acute *Schistosoma mansoni* infection', *Eur J Immunol*, 28: 1408-16.
- Fanning, S., and A.P. Mitchell. 2012. 'Fungal biofilms', *PLoS Pathog*, 8: e1002585.
- Farnoud, A.M., A.M. Bryan, T. Kechichian, C. Luberto, and M. Del Poeta. 2015. 'The Granuloma Response Controlling Cryptococcosis in Mice Depends on the Sphingosine Kinase 1-Sphingosine 1-Phosphate Pathway', *Infect Immun*, 83: 2705-13.
- Faurschou, M., and N. Borregaard. 2003. 'Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation', *Microbes Infect*, 5: 1317-27.
- Fernandez, M., E.H. Moylett, D.E. Noyola, and C.J. Baker. 2000. 'Candidal meningitis in neonates: a 10-year review', *Clin Infect Dis*, 31: 458-63.
- Ferrante, A. 1989. 'Tumor necrosis factor alpha potentiates neutrophil antimicrobial activity: increased fungicidal activity against *Torulopsis glabrata* and *Candida albicans* and associated increases in oxygen radical production and lysosomal enzyme release', *Infect Immun*, 57: 2115-22.
- Ferwerda, B., G. Ferwerda, T.S. Plantinga, J.A. Willment, A.B. van Spriel, et al. 2009. 'Human dectin-1 deficiency and mucocutaneous fungal infections', *N Engl J Med*, 361: 1760-7.
- Fidel, P.L., Jr. 2005. 'Immunity in vaginal candidiasis', *Curr Opin Infect Dis*, 18: 107-11.
- Fidel, P.L., Jr. 2011. 'Candida-host interactions in HIV disease: implications for oropharyngeal candidiasis', *Adv Dent Res*, 23: 45-9.

- Fidel, P.L., Jr., J.A. Vazquez, and J.D. Sobel. 1999. 'Candida glabrata: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to C. albicans', *Clin Microbiol Rev*, 12: 80-96.
- Finkel, J.S., and A.P. Mitchell. 2011. 'Genetic control of Candida albicans biofilm development', *Nat Rev Microbiol*, 9: 109-18.
- Fradin, C., E.S. Bernardes, and T. Jouault. 2015. 'Candida albicans phospholipomannan: a sweet spot for controlling host response/inflammation', *Semin Immunopathol*, 37: 123-30.
- Gacser, A., F. Stehr, C. Kroger, L. Kredics, W. Schafer, and J.D. Nosanchuk. 2007. 'Lipase 8 affects the pathogenesis of Candida albicans', *Infect Immun*, 75: 4710-8.
- Gaforio, J.J., E. Ortega, I. Algarra, M.J. Serrano, and G. Alvarez de Cienfuegos. 2002. 'NK cells mediate increase of phagocytic activity but not of proinflammatory cytokine (interleukin-6 [IL-6], tumor necrosis factor alpha, and IL-12) production elicited in splenic macrophages by tilorone treatment of mice during acute systemic candidiasis', *Clin Diagn Lab Immunol*, 9: 1282-94.
- Gazendam, R.P., A. van de Geer, D. Roos, T.K. van den Berg, and T.W. Kuijpers. 2016. 'How neutrophils kill fungi', *Immunol Rev*, 273: 299-311.
- Gazendam, R.P., J.L. van Hamme, A.T. Tool, M. van Houdt, P.J. Verkuijlen, et al. 2014. 'Two independent killing mechanisms of Candida albicans by human neutrophils: evidence from innate immunity defects', *Blood*, 124: 590-7.
- Geiger, J., D. Wessels, S.R. Lockhart, and D.R. Soll. 2004. 'Release of a potent polymorphonuclear leukocyte chemoattractant is regulated by white-opaque switching in Candida albicans', *Infect Immun*, 72: 667-77.
- Geramizadeh, B., R. Jahangiri, and E. Moradi. 2011. 'Causes of hepatic granuloma: a 12-year single center experience from southern Iran', *Arch Iran Med*, 14: 288-9.
- Ghaleb, M., M. Hamad, and K.H. Abu-Elteen. 2003. 'Vaginal T lymphocyte population kinetics during experimental vaginal candidosis: evidence for a possible role of CD8+ T cells in protection against vaginal candidosis', *Clin Exp Immunol*, 131: 26-33.
- Ghannoum, M.A. 2000. 'Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis', *Clin Microbiol Rev*, 13: 122-43, table of contents.
- Ghosh, S., N. Howe, K. Volk, S. Tati, K.W. Nickerson, and T.M. Petro. 2010. 'Candida albicans cell wall components and farnesol stimulate the expression of both inflammatory and regulatory cytokines in the murine RAW264.7 macrophage cell line', *FEMS Immunol Med Microbiol*, 60: 63-73.
- Ghosh, S., B.W. Kebaara, A.L. Atkin, and K.W. Nickerson. 2008. 'Regulation of aromatic alcohol production in Candida albicans', *Appl Environ Microbiol*, 74: 7211-8.
- Gideon, H.P., J. Phuah, A.J. Myers, B.D. Bryson, M.A. Rodgers, et al. 2015. 'Variability in tuberculosis granuloma T cell responses exists, but a balance of pro- and anti-inflammatory cytokines is associated with sterilization', *PLoS Pathog*, 11: e1004603.
- Giraldo, N.A., N.I. Bolanos, A. Cuellar, F. Guzman, A.M. Uribe, et al. 2011. 'Increased CD4+/CD8+ double-positive T cells in chronic Chagasic patients', *PLoS Negl Trop Dis*, 5: e1294.
- Girgis, N.M., U.M. Gundra, L.N. Ward, M. Cabrera, U. Frevert, and P. Loke. 2014. 'Ly6C(high) monocytes become alternatively activated macrophages in schistosome granulomas with help from CD4+ cells', *PLoS Pathog*, 10: e1004080.

- Girmenia, C., P. Martino, F. De Bernardis, M. Boccanera, and A. Cassone. 2004. 'Lack of circulating Candida mannoprotein antigen in patients with focal hepatosplenic candidiasis', *J Med Microbiol*, 53: 103-6.
- Glocker, E.O., A. Hennigs, M. Nabavi, A.A. Schaffer, C. Woellner, et al. 2009. 'A homozygous CARD9 mutation in a family with susceptibility to fungal infections', *N Engl J Med*, 361: 1727-35.
- Glockner, A., and O.A. Cornely. 2015. 'Candida glabrata--unique features and challenges in the clinical management of invasive infections', *Mycoses*, 58: 445-50.
- Goncalves, B., C. Ferreira, C.T. Alves, M. Henriques, J. Azeredo, and S. Silva. 2016. 'Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors', *Crit Rev Microbiol*, 42: 905-27.
- Gow, N.A., F.L. van de Veerdonk, A.J. Brown, and M.G. Netea. 2011. 'Candida albicans morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization', *Nat Rev Microbiol*, 10: 112-22.
- Greenblatt, M.B., A. Aliprantis, B. Hu, and L.H. Glimcher. 2010. 'Calcineurin regulates innate antifungal immunity in neutrophils', *J Exp Med*, 207: 923-31.
- Guinea, J. 2014. 'Global trends in the distribution of Candida species causing candidemia', *Clin Microbiol Infect*, 20 Suppl 6: 5-10.
- Guirado, E., U. Mbawuike, T.L. Keiser, J. Arcos, A.K. Azad, S.H. Wang, and L.S. Schlesinger. 2015. 'Characterization of host and microbial determinants in individuals with latent tuberculosis infection using a human granuloma model', *MBio*, 6: e02537-14.
- Guirado, E., and L.S. Schlesinger. 2013. 'Modeling the Mycobacterium tuberculosis Granuloma - the Critical Battlefield in Host Immunity and Disease', *Front Immunol*, 4: 98.
- Haddadi, P., S. Zareifar, P. Badiee, A. Alborzi, M. Mokhtari, et al. 2014. 'Yeast colonization and drug susceptibility pattern in the pediatric patients with neutropenia', *Jundishapur J Microbiol*, 7: e11858.
- Halkic, N., and R. Ksontini. 2007. 'Images in clinical medicine. Hepatosplenic candidiasis', *N Engl J Med*, 356: e4.
- Hams, E., G. Aviello, and P.G. Fallon. 2013. 'The schistosoma granuloma: friend or foe?', *Front Immunol*, 4: 89.
- Hanna, D.B., L.S. Gupta, L.E. Jones, D.M. Thompson, S.E. Kellerman, and J.E. Sackoff. 2007. 'AIDS-defining opportunistic illnesses in the HAART era in New York City', *AIDS Care*, 19: 264-72.
- Hasibeder, W., and M. Halabi. 2014. 'Candida peritonitis', *Minerva Anestesiol*, 80: 470-81.
- Heald, A.H., D.J. O'Halloran, K. Richards, F. Webb, S. Jenkins, et al. 2001. 'Fungal infection of the diabetic foot: two distinct syndromes', *Diabet Med*, 18: 567-72.
- Heinemann, D.E., J.H. Peters, and M. Gahr. 1997. 'A human in vitro granuloma model using heat killed Candida albicans cells immobilized on plastic culture wells', *Scand J Immunol*, 45: 596-604.
- Heninger, E., L.H. Hogan, J. Karman, S. Macvilay, B. Hill, J.P. Woods, and M. Sandor. 2006. 'Characterization of the Histoplasma capsulatum-induced granuloma', *J Immunol*, 177: 3303-13.
- Herbert, D.R., C. Holscher, M. Mohrs, B. Arendse, A. Schwegmann, et al. 2004. 'Alternative macrophage activation is essential for survival during schistosomiasis and downmodulates T helper 1 responses and immunopathology', *Immunity*, 20: 623-35.

- Hernandez-Santos, N., A.R. Huppler, A.C. Peterson, S.A. Khader, K.C. McKenna, and S.L. Gaffen. 2013. 'Th17 cells confer long-term adaptive immunity to oral mucosal *Candida albicans* infections', *Mucosal Immunol*, 6: 900-10.
- Hibbett, D.S., M. Binder, J.F. Bischoff, M. Blackwell, P.F. Cannon, et al. 2007. 'A higher-level phylogenetic classification of the Fungi', *Mycol Res*, 111: 509-47.
- Hoag, K.A., M.F. Lipscomb, A.A. Izzo, and N.E. Street. 1997. 'IL-12 and IFN-gamma are required for initiating the protective Th1 response to pulmonary cryptococcosis in resistant C.B-17 mice', *Am J Respir Cell Mol Biol*, 17: 733-9.
- Hoarau, G., O. Kerdraon, M. Lagree, M. Vinchon, N. Francois, F. Dubos, and B. Sendid. 2013. 'Detection of (1,3)-beta-D-glucans in situ in a *Candida albicans* brain granuloma', *J Infect*, 67: 622-4.
- Hohl, T.M., A. Rivera, L. Lipuma, A. Gallegos, C. Shi, M. Mack, and E.G. Pamer. 2009. 'Inflammatory monocytes facilitate adaptive CD4 T cell responses during respiratory fungal infection', *Cell Host Microbe*, 6: 470-81.
- Holz, O., L. Tan, F. Schaumann, M. Muller, D. Scholl, et al. 2015. 'Inter- and intrasubject variability of the inflammatory response to segmental endotoxin challenge in healthy volunteers', *Pulm Pharmacol Ther*, 35: 50-9.
- Hong, W., W. Liao, and J. Gu. 2000. 'Case report. Granuloma caused by *Cryptococcus neoformans*', *Mycoses*, 43: 71-4.
- Hope, W.W., G.L. Drusano, C.B. Moore, A. Sharp, A. Louie, et al. 2007. 'Effect of neutropenia and treatment delay on the response to antifungal agents in experimental disseminated candidiasis', *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 285-95.
- Hopke, A., N. Nicke, E.E. Hidu, G. Degani, L. Popolo, and R.T. Wheeler. 2016. 'Neutrophil Attack Triggers Extracellular Trap-Dependent *Candida* Cell Wall Remodeling and Altered Immune Recognition', *PLoS Pathog*, 12: e1005644.
- Horn, D.L., D. Neofytos, E.J. Anaissie, J.A. Fishman, W.J. Steinbach, et al. 2009. 'Epidemiology and outcomes of candidemia in 2019 patients: data from the prospective antifungal therapy alliance registry', *Clin Infect Dis*, 48: 1695-703.
- Horn, D.L., L. Ostrosky-Zeichner, M.I. Morris, A.J. Ullmann, C. Wu, et al. 2010. 'Factors related to survival and treatment success in invasive candidiasis or candidemia: a pooled analysis of two large, prospective, micafungin trials', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 29: 223-9.
- Horn, F., T. Heinekamp, O. Kniemeyer, J. Pollmacher, V. Valiante, and A.A. Brakhage. 2012. 'Systems biology of fungal infection', *Front Microbiol*, 3: 108.
- Hornby, J.M., E.C. Jensen, A.D. Lise, J.J. Tasto, B. Jahnke, et al. 2001. 'Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol', *Appl Environ Microbiol*, 67: 2982-92.
- Hoyer, L.L. 2001. 'The ALS gene family of *Candida albicans*', *Trends Microbiol*, 9: 176-80.
- Hoyer, L.L., C.B. Green, S.H. Oh, and X. Zhao. 2008. 'Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit', *Med Mycol*, 46: 1-15.
- Huang, W., L. Na, P.L. Fidel, and P. Schwarzenberger. 2004. 'Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice', *J Infect Dis*, 190: 624-31.
- Hube, B. 2004. 'From commensal to pathogen: stage- and tissue-specific gene expression of *Candida albicans*', *Curr Opin Microbiol*, 7: 336-41.

- Hube, B., M. Monod, D.A. Schofield, A.J. Brown, and N.A. Gow. 1994. 'Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*', *Mol Microbiol*, 14: 87-99.
- Huppler, A.R., H.R. Conti, N. Hernandez-Santos, T. Darville, P.S. Biswas, and S.L. Gaffen. 2014. 'Role of neutrophils in IL-17-dependent immunity to mucosal candidiasis', *J Immunol*, 192: 1745-52.
- Ifrim, D.C., J.M. Bain, D.M. Reid, M. Oosting, I. Verschueren, et al. 2014. 'Role of Dectin-2 for host defense against systemic infection with *Candida glabrata*', *Infect Immun*, 82: 1064-73.
- Ikeda, K., J. Yamashita, H. Fujisawa, and S. Fujita. 1990. 'Cerebral granuloma and meningitis caused by *Candida albicans*: useful monitoring of mannan antigen in cerebrospinal fluid', *Neurosurgery*, 26: 860-3.
- Inglis, D.O., and G. Sherlock. 2013. 'Ras signaling gets fine-tuned: regulation of multiple pathogenic traits of *Candida albicans*', *Eukaryot Cell*, 12: 1316-25.
- Jabra-Rizk, M.A., E.F. Kong, C. Tsui, M.H. Nguyen, C.J. Clancy, P.L. Fidel, Jr., and M. Noverr. 2016. '*Candida albicans* Pathogenesis: Fitting within the Host-Microbe Damage Response Framework', *Infect Immun*, 84: 2724-39.
- Jacobsen, I.D., K. Grosse, A. Berndt, and B. Hube. 2011. 'Pathogenesis of *Candida albicans* infections in the alternative chorio-allantoic membrane chicken embryo model resembles systemic murine infections', *PLoS One*, 6: e19741.
- Jacobsen, I.D., D. Wilson, B. Wachtler, S. Brunke, J.R. Naglik, and B. Hube. 2012. '*Candida albicans* dimorphism as a therapeutic target', *Expert Rev Anti Infect Ther*, 10: 85-93.
- Jaeger, M., R. van der Lee, S.C. Cheng, M.D. Johnson, V. Kumar, et al. 2015. 'The RIG-I-like helicase receptor MDA5 (IFIH1) is involved in the host defense against *Candida* infections', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 34: 963-74.
- Jayatilake, J.A., Y.H. Samaranayake, and L.P. Samaranayake. 2005. 'An ultrastructural and a cytochemical study of candidal invasion of reconstituted human oral epithelium', *J Oral Pathol Med*, 34: 240-6.
- Johnson. 2009. 'Rare and Emerging *Candida* species', *Current Fungal Infection Reports*, 3: 152-59.
- Johnson, C.J., J. Cabezas-Olcoz, J.F. Kernien, S.X. Wang, D.J. Beebe, et al. 2016. 'The Extracellular Matrix of *Candida albicans* Biofilms Impairs Formation of Neutrophil Extracellular Traps', *PLoS Pathog*, 12: e1005884.
- Johnson, E., A. Espinel-Ingroff, A. Szekely, H. Hockey, and P. Troke. 2008. 'Activity of voriconazole, itraconazole, fluconazole and amphotericin B in vitro against 1763 yeasts from 472 patients in the voriconazole phase III clinical studies', *Int J Antimicrob Agents*, 32: 511-4.
- Jones-Carson, J., F.A. Vazquez-Torres, and E. Balish. 1997. 'B cell-independent selection of memory T cells after mucosal immunization with *Candida albicans*', *J Immunol*, 158: 4328-35.
- Jouault, T., S. Ibata-Ombetta, O. Takeuchi, P.A. Trinel, P. Sacchetti, et al. 2003. '*Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors', *J Infect Dis*, 188: 165-72.
- Karthaus, M., H. Hebart, H. Einsele, H. Schaefer, H. Scheel-Walter, D. Buchheidt, and T. Lehrnbecher. 2006. 'Long-term survival in patients with acute leukemia and chronic disseminated candidiasis despite minimal antileukemic therapy', *Haematologica*, 91: 1422-3.

- Kasama, T., Y. Miwa, T. Isozaki, T. Odai, M. Adachi, and S.L. Kunkel. 2005. 'Neutrophil-derived cytokines: potential therapeutic targets in inflammation', *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 4: 273-9.
- Kashem, S.W., B.Z. Igyarto, M. Gerami-Nejad, Y. Kumamoto, J. Mohammed, et al. 2015. 'Candida albicans morphology and dendritic cell subsets determine T helper cell differentiation', *Immunity*, 42: 356-66.
- Kauffman, C.A. 2015. 'Complications of Candidemia in ICU Patients: Endophthalmitis, Osteomyelitis, Endocarditis', *Semin Respir Crit Care Med*, 36: 641-9.
- Kauffman, C.A., M.J. Shea, and P.T. Frame. 1981. 'Invasive fungal infections in patients with chronic mucocutaneous candidiasis', *Arch Intern Med*, 141: 1076-9.
- Kaur, R., B. Ma, and B.P. Cormack. 2007. 'A family of glycosylphosphatidylinositol-linked aspartyl proteases is required for virulence of *Candida glabrata*', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104: 7628-33.
- Kawakami, T., J. He, H. Morita, K. Yokoyama, H. Kaji, et al. 2014. 'Rab27a is essential for the formation of neutrophil extracellular traps (NETs) in neutrophil-like differentiated HL60 cells', *PLoS One*, 9: e84704.
- Kaye, P.M., M. Svensson, M. Ato, A. Maroof, R. Polley, et al. 2004. 'The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis', *Immunol Rev*, 201: 239-53.
- Kenno, S., S. Perito, P. Mosci, A. Vecchiarelli, and C. Monari. 2016. 'Autophagy and Reactive Oxygen Species Are Involved in Neutrophil Extracellular Traps Release Induced by *C. albicans* Morphotypes', *Front Microbiol*, 7: 879.
- Keppler-Ross, S., L. Douglas, J.B. Konopka, and N. Dean. 2010. 'Recognition of yeast by murine macrophages requires mannan but not glucan', *Eukaryot Cell*, 9: 1776-87.
- Klatt, N.R., and J.M. Brenchley. 2010. 'Th17 cell dynamics in HIV infection', *Curr Opin HIV AIDS*, 5: 135-40.
- Klingspor, L., A.M. Tortorano, J. Peman, B. Willinger, P. Hamal, et al. 2015. 'Invasive *Candida* infections in surgical patients in intensive care units: a prospective, multicentre survey initiated by the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) (2006-2008)', *Clin Microbiol Infect*, 21: 87 e1-87 e10.
- Kobayashi, K., K. Kaneda, and T. Kasama. 2001a. 'Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity', *Microsc Res Tech*, 53: 241-5.
- Kobayashi, M., M. Ito, K. Sano, and M. Koyama. 2001b. 'Granulomatous and cytokine responses to pulmonary *Cryptococcus neoformans* in two strains of rats', *Mycopathologia*, 151: 121-30.
- Koh, A.Y. 2013. 'Murine models of *Candida* gastrointestinal colonization and dissemination', *Eukaryot Cell*, 12: 1416-22.
- Koh, A.Y., J.R. Kohler, K.T. Cogshall, N. Van Rooijen, and G.B. Pier. 2008. 'Mucosal damage and neutropenia are required for *Candida albicans* dissemination', *PLoS Pathog*, 4: e35.
- Kong, E.F., P. Fidel, Jr., and M.A. Jabra-Rizk. 2015. '*Candida albicans*: Love-Hate Relationship with Its Human Host', *Microbe*, 10: 413-18.
- Kontoyiannis, D.P., M.A. Luna, B.I. Samuels, and G.P. Bodey. 2000. 'Hepatosplenic candidiasis. A manifestation of chronic disseminated candidiasis', *Infect Dis Clin North Am*, 14: 721-39.
- Koziol-Montewka, M., A. Magrys, J. Paluch-Oles, A. Bogut, K. Buczynski, and S. Jablonka. 2006. 'MPO and cytokines in the serum of cancer patients in the context of *Candida* colonization and infection', *Immunol Invest*, 35: 167-79.
- Krysan, D.J., F.S. Sutterwala, and M. Wellington. 2014. 'Catching fire: *Candida albicans*, macrophages, and pyroptosis', *PLoS Pathog*, 10: e1004139.

- Kumamoto, C.A., and M.D. Vences. 2005. 'Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence', *Cell Microbiol*, 7: 1546-54.
- Kuo, Z.Y., Y.J. Chuang, C.C. Chao, F.C. Liu, C.Y. Lan, and B.S. Chen. 2013. 'Identification of infection- and defense-related genes via a dynamic host-pathogen interaction network using a *Candida albicans*-zebrafish infection model', *J Innate Immun*, 5: 137-52.
- Kvaal, C., S.A. Lachke, T. Srikantha, K. Daniels, J. McCoy, and D.R. Soll. 1999. 'Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection', *Infect Immun*, 67: 6652-62.
- Kvaal, C.A., T. Srikantha, and D.R. Soll. 1997. 'Misexpression of the white-phase-specific gene WH11 in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence', *Infect Immun*, 65: 4468-75.
- La Gioia, A., M. Bombara, F. Fiorini, M. Dell'Amico, A. Devito, et al. 2016. 'Earlier detection of sepsis by *Candida parapsilosis* using three-dimensional cytographic anomalies on the Mindray BC-6800 hematological analyzer', *Clin Chem Lab Med*, 54: e239-42.
- Larsen, R.A. 2011. 'Flucytosine.' in C.A. Kauffman, P.G. Pappas, J. D. Sobel and W.E. Dismukes (eds.), *Essentials of Clinical Mycology*.
- Lau, A., T.C. Sorrell, S. Chen, K. Stanley, J. Iredell, and C. Halliday. 2008. 'Multiplex tandem PCR: a novel platform for rapid detection and identification of fungal pathogens from blood culture specimens', *J Clin Microbiol*, 46: 3021-7.
- Lazarevic, V., and J. Flynn. 2002. 'CD8+ T cells in tuberculosis', *Am J Respir Crit Care Med*, 166: 1116-21.
- Legrand, F., M. Lecuit, B. Dupont, E. Bellaton, M. Huerre, P.S. Rohrlich, and O. Lortholary. 2008. 'Adjuvant corticosteroid therapy for chronic disseminated candidiasis', *Clin Infect Dis*, 46: 696-702.
- Leroy, O., J.P. Gangneux, P. Montravers, J.P. Mira, F. Gouin, et al. 2009. 'Epidemiology, management, and risk factors for death of invasive *Candida* infections in critical care: a multicenter, prospective, observational study in France (2005-2006)', *Crit Care Med*, 37: 1612-8.
- Lewis, L.E., J.M. Bain, C. Lowes, C. Gillespie, F.M. Rudkin, N.A. Gow, and L.P. Erwig. 2012. 'Stage specific assessment of *Candida albicans* phagocytosis by macrophages identifies cell wall composition and morphogenesis as key determinants', *PLoS Pathog*, 8: e1002578.
- Li, M., Q. Chen, Y. Shen, and W. Liu. 2009. '*Candida albicans* phospholipomannan triggers inflammatory responses of human keratinocytes through Toll-like receptor 2', *Exp Dermatol*, 18: 603-10.
- Li, S.S., S.K. Kyei, M. Timm-McCann, H. Ogbomo, G.J. Jones, et al. 2013. 'The NK receptor NKp30 mediates direct fungal recognition and killing and is diminished in NK cells from HIV-infected patients', *Cell Host Microbe*, 14: 387-97.
- Lin, D., L.-C. Wu, M.G. Rinaldi, and P.F. Lehmann. 1995. 'Three Distinct Genotypes within *Candida parapsilosis* from Clinical Sources', *Journal of Clinical Microbiology*, 33: 1815-21.
- Lin, J.S., and B.A. Wu-Hsieh. 2004. 'Functional T cells in primary immune response to histoplasmosis', *Int Immunol*, 16: 1663-73.
- Linden, J.R., M.A. Maccani, S.S. Laforce-Nesbitt, and J.M. Bliss. 2010. 'High efficiency opsonin-independent phagocytosis of *Candida parapsilosis* by human neutrophils', *Med Mycol*, 48: 355-64.

- Lindsay, A.K., A. Deveau, A.E. Piispanen, and D.A. Hogan. 2012. 'Farnesol and cyclic AMP signaling effects on the hypha-to-yeast transition in *Candida albicans*', *Eukaryot Cell*, 11: 1219-25.
- Lionakis, M.S., B.G. Fischer, J.K. Lim, M. Swamydas, W. Wan, et al. 2012. 'Chemokine receptor Ccr1 drives neutrophil-mediated kidney immunopathology and mortality in invasive candidiasis', *PLoS Pathog*, 8: e1002865.
- Lionakis, M.S., J.K. Lim, C.C. Lee, and P.M. Murphy. 2011. 'Organ-specific innate immune responses in a mouse model of invasive candidiasis', *J Innate Immun*, 3: 180-99.
- Lionakis, M.S., and M.G. Netea. 2013. 'Candida and host determinants of susceptibility to invasive candidiasis', *PLoS Pathog*, 9: e1003079.
- Lionakis, M.S., M. Swamydas, B.G. Fischer, T.S. Plantinga, M.D. Johnson, et al. 2013. 'CX3CR1-dependent renal macrophage survival promotes *Candida* control and host survival', *J Clin Invest*, 123: 5035-51.
- Lisboa, C., A. Santos, C. Dias, F. Azevedo, C. Pina-Vaz, and A. Rodrigues. 2010. 'Candida balanitis: risk factors', *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 24: 820-6.
- Liu, L., S. Okada, X.F. Kong, A.Y. Kreins, S. Cypowyj, et al. 2011. 'Gain-of-function human STAT1 mutations impair IL-17 immunity and underlie chronic mucocutaneous candidiasis', *J Exp Med*, 208: 1635-48.
- Liu, Y., and S.G. Filler. 2011. '*Candida albicans* Als3, a multifunctional adhesin and invasin', *Eukaryot Cell*, 10: 168-73.
- Lo, H.J., J.R. Kohler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, and G.R. Fink. 1997. 'Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent', *Cell*, 90: 939-49.
- Lockhart, E., A.M. Green, and J.L. Flynn. 2006. 'IL-17 production is dominated by gamma delta T cells rather than CD4 T cells during *Mycobacterium tuberculosis* infection', *J Immunol*, 177: 4662-9.
- Lockhart, S.R., S.A. Messer, M. Gherna, J.A. Bishop, W.G. Merz, M.A. Pfaller, and D.J. Diekema. 2009. 'Identification of *Candida nivariensis* and *Candida bracarensis* in a large global collection of *Candida glabrata* isolates: comparison to the literature', *J Clin Microbiol*, 47: 1216-7.
- Lockhart, S.R., S.A. Messer, M.A. Pfaller, and D.J. Diekema. 2008. 'Geographic distribution and antifungal susceptibility of the newly described species *Candida orthopsilosis* and *Candida metapsilosis* in comparison to the closely related species *Candida parapsilosis*', *J Clin Microbiol*, 46: 2659-64.
- Lopez-Ribot, J.L., M. Casanova, A. Murgui, and J.P. Martinez. 2004. 'Antibody response to *Candida albicans* cell wall antigens', *FEMS Immunol Med Microbiol*, 41: 187-96.
- Lortholary, O., M. Desnos-Ollivier, K. Sitbon, A. Fontanet, S. Bretagne, F. Dromer, and G. French Mycosis Study. 2011. 'Recent exposure to caspofungin or fluconazole influences the epidemiology of candidemia: a prospective multicenter study involving 2,441 patients', *Antimicrob Agents Chemother*, 55: 532-8.
- Lortholary, O., C. Renaudat, K. Sitbon, Y. Madec, L. Denoeud-Ndam, et al. 2014. 'Worrisome trends in incidence and mortality of candidemia in intensive care units (Paris area, 2002-2010)', *Intensive Care Med*, 40: 1303-12.
- Lu, Y., C. Su, and H. Liu. 2012. 'A GATA transcription factor recruits Hda1 in response to reduced Tor1 signaling to establish a hyphal chromatin state in *Candida albicans*', *PLoS Pathog*, 8: e1002663.
- Lu, Y., C. Su, A. Wang, and H. Liu. 2011. 'Hyphal development in *Candida albicans* requires two temporally linked changes in promoter chromatin for initiation and maintenance', *PLoS Biol*, 9: e1001105.

- Lugo-Villarino, G., D. Hudrisier, A. Benard, and O. Neyrolles. 2012. 'Emerging trends in the formation and function of tuberculosis granulomas', *Front Immunol*, 3: 405.
- Luo, G., L.P. Samaranayake, B.P. Cheung, and G. Tang. 2004. 'Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in in vitro haemolysin production', *APMIS*, 112: 283-90.
- Lupetti, A., R. Danesi, M. Campa, M. Del Tacca, and S. Kelly. 2002. 'Molecular basis of resistance to azole antifungals', *Trends Mol Med*, 8: 76-81.
- Macchia, I., M.C. Gauduin, A. Kaur, and R.P. Johnson. 2006. 'Expression of CD8alpha identifies a distinct subset of effector memory CD4+ T lymphocytes', *Immunology*, 119: 232-42.
- MacDonald, A.S., A.D. Straw, N.M. Dalton, and E.J. Pearce. 2002. 'Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40', *J Immunol*, 168: 537-40.
- Majer, O., C. Bourgeois, F. Zwolanek, C. Lassnig, D. Kerjaschki, et al. 2012. 'Type I interferons promote fatal immunopathology by regulating inflammatory monocytes and neutrophils during *Candida* infections', *PLoS Pathog*, 8: e1002811.
- Mansour, M.K., and S.M. Levitz. 2002. 'Interactions of fungi with phagocytes', *Curr Opin Microbiol*, 5: 359-65.
- Marcil, A., D. Harcus, D.Y. Thomas, and M. Whiteway. 2002. '*Candida albicans* killing by RAW 264.7 mouse macrophage cells: effects of *Candida* genotype, infection ratios, and gamma interferon treatment', *Infect Immun*, 70: 6319-29.
- Marodi, L., H.M. Korchak, and R.B. Johnston, Jr. 1991. 'Mechanisms of host defense against *Candida* species. I. Phagocytosis by monocytes and monocyte-derived macrophages', *J Immunol*, 146: 2783-9.
- Marodi, L., S. Schreiber, D.C. Anderson, R.P. MacDermott, H.M. Korchak, and R.B. Johnston, Jr. 1993. 'Enhancement of macrophage candidacidal activity by interferon-gamma. Increased phagocytosis, killing, and calcium signal mediated by a decreased number of mannose receptors', *J Clin Invest*, 91: 2596-601.
- Martin, F., and U. Nehls. 2009. 'Harnessing ectomycorrhizal genomics for ecological insights', *Curr Opin Plant Biol*, 12: 508-15.
- Martinez, L.R., and A. Casadevall. 2005. 'Specific antibody can prevent fungal biofilm formation and this effect correlates with protective efficacy', *Infect Immun*, 73: 6350-62.
- Martinez-Gallo, M., C. Puy, R. Ruiz-Hernandez, J.M. Rodriguez-Arias, M. Bofill, et al. 2008. 'Severe and recurrent episodes of bronchiolitis obliterans organising pneumonia associated with indolent CD4+ CD8+ T-cell leukaemia', *Eur Respir J*, 31: 1368-72.
- Martins, N., I.C. Ferreira, L. Barros, S. Silva, and M. Henriques. 2014. 'Candidiasis: predisposing factors, prevention, diagnosis and alternative treatment', *Mycopathologia*, 177: 223-40.
- Masood, A., and S. Sallah. 2005. 'Chronic disseminated candidiasis in patients with acute leukemia: emphasis on diagnostic definition and treatment', *Leuk Res*, 29: 493-501.
- Mathews, H.L., and L. Witek-Janusek. 1998. 'Antifungal activity of interleukin-2-activated natural killer (NK1.1+) lymphocytes against *Candida albicans*', *J Med Microbiol*, 47: 1007-14.
- Maubon, D., C. Garnaud, T. Calandra, D. Sanglard, and M. Cornet. 2014. 'Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now?', *Intensive Care Med*, 40: 1241-55.

- McDonald, J.U., M. Rosas, G.D. Brown, S.A. Jones, and P.R. Taylor. 2012. 'Differential dependencies of monocytes and neutrophils on dectin-1, dectin-2 and complement for the recognition of fungal particles in inflammation', *PLoS One*, 7: e45781.
- Meis, J.F., M. Ruhnke, B.E. De Pauw, F.C. Odds, W. Siegert, and P.E. Verweij. 1999. 'Candida dubliniensis candidemia in patients with chemotherapy-induced neutropenia and bone marrow transplantation', *Emerg Infect Dis*, 5: 150-3.
- Merseguel, K.B., A.S. Nishikaku, A.M. Rodrigues, A.C. Padovan, R.C. e Ferreira, et al. 2015. 'Genetic diversity of medically important and emerging Candida species causing invasive infection', *BMC Infect Dis*, 15: 57.
- Metzler, K.D., T.A. Fuchs, W.M. Nauseef, D. Reumaux, J. Roesler, et al. 2011. 'Myeloperoxidase is required for neutrophil extracellular trap formation: implications for innate immunity', *Blood*, 117: 953-9.
- Miller, M.G., and A.D. Johnson. 2002. 'White-opaque switching in Candida albicans is controlled by mating-type locus homeodomain proteins and allows efficient mating', *Cell*, 110: 293-302.
- Milner, J.D., and S.M. Holland. 2013. 'The cup runneth over: lessons from the ever-expanding pool of primary immunodeficiency diseases', *Nat Rev Immunol*, 13: 635-48.
- Miri, S.M., A. Tayebi Meybodi, Z. Habibi, and M. Mohseni. 2012. 'Fungal granuloma of the brain in a case of chronic mucocutaneous candidiasis', *Arch Iran Med*, 15: 452-4.
- Misme-Aucouturier, B., M. Albassier, N. Alvarez-Rueda, and P. Le Pape. 2017. 'Specific Human and Candida Cellular Interactions Lead to Controlled or Persistent Infection Outcomes during Granuloma-Like Formation', *Infect Immun*, 85.
- Miyauchi, M., P. Giummelly, S. Yazawa, and Y. Okawa. 2007. 'Adhesion of Candida albicans to HeLa cells: studies using polystyrene beads', *Biol Pharm Bull*, 30: 588-90.
- Moore, D.L., D.I. Grove, and K.S. Warren. 1977. 'The Schistosoma mansoni egg granuloma: quantitation of cell populations', *J Pathol*, 121: 41-50.
- Moragues, M.D., M.J. Omaetxebarria, N. Elguezabal, M.J. Sevilla, S. Conti, L. Polonelli, and J. Ponton. 2003. 'A monoclonal antibody directed against a Candida albicans cell wall mannoprotein exerts three anti-C. albicans activities', *Infect Immun*, 71: 5273-9.
- Moreno, A., M. Marazuela, M. Yebra, M.J. Hernandez, T. Hellin, C. Montalban, and J.A. Vargas. 1988. 'Hepatic fibrin-ring granulomas in visceral leishmaniasis', *Gastroenterology*, 95: 1123-6.
- Moreno-Ruiz, E., M. Galan-Diez, W. Zhu, E. Fernandez-Ruiz, C. d'Enfert, et al. 2009. 'Candida albicans internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism', *Cell Microbiol*, 11: 1179-89.
- Morio, F., C. Loge, B. Besse, C. Hennequin, and P. Le Pape. 2010. 'Screening for amino acid substitutions in the Candida albicans Erg11 protein of azole-susceptible and azole-resistant clinical isolates: new substitutions and a review of the literature', *Diagn Microbiol Infect Dis*, 66: 373-84.
- Morio, F., F. Pagniez, C. Lacroix, M. Miegerville, and P. Le Pape. 2012. 'Amino acid substitutions in the Candida albicans sterol Delta5,6-desaturase (Erg3p) confer azole resistance: characterization of two novel mutants with impaired virulence', *J Antimicrob Chemother*, 67: 2131-8.
- Morschhauser, J. 2010. 'Regulation of white-opaque switching in Candida albicans', *Med Microbiol Immunol*, 199: 165-72.

- Munayyer, H.K., P.A. Mann, A.S. Chau, T. Yarosh-Tomaine, J.R. Greene, et al. 2004. 'Posaconazole is a potent inhibitor of sterol 14 α -demethylation in yeasts and molds', *Antimicrob Agents Chemother*, 48: 3690-6.
- Murad, A.M., P. Leng, M. Straffon, J. Wishart, S. Macaskill, et al. 2001. 'NRG1 represses yeast-hypha morphogenesis and hypha-specific gene expression in *Candida albicans*', *EMBO J*, 20: 4742-52.
- Murray, H.W. 2001. 'Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis', *Int J Exp Pathol*, 82: 249-67.
- Myers, T.A., J.E. Leigh, A.R. Arribas, S. Hager, R. Clark, E. Lilly, and P.L. Fidel, Jr. 2003. 'Immunohistochemical evaluation of T cells in oral lesions from human immunodeficiency virus-positive persons with oropharyngeal candidiasis', *Infect Immun*, 71: 956-63.
- Nadeem, S.G., A. Shafiq, S.T. Hakim, Y. Anjum, and S. U. Kazm. 2013. 'Effect of Growth Media, pH and Temperature on Yeast to Hyphal Transition in *Candida albicans*', *Open Journal of Medical Microbiology*, 03: 185-92.
- Naglik, J., A. Albrecht, O. Bader, and B. Hube. 2004. 'Candida albicans proteinases and host/pathogen interactions', *Cell Microbiol*, 6: 915-26.
- Naglik, J.R., S.J. Challacombe, and B. Hube. 2003. 'Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis', *Microbiol Mol Biol Rev*, 67: 400-28, table of contents.
- Nahum, A., H. Dadi, A. Bates, and C.M. Roifman. 2011. 'The L412F variant of Toll-like receptor 3 (TLR3) is associated with cutaneous candidiasis, increased susceptibility to cytomegalovirus, and autoimmunity', *J Allergy Clin Immunol*, 127: 528-31.
- Nascimbeni, M., S. Pol, and B. Saunier. 2011. 'Distinct CD4⁺ CD8⁺ double-positive T cells in the blood and liver of patients during chronic hepatitis B and C', *PLoS One*, 6: e20145.
- Naseem, S., D. Frank, J.B. Konopka, and N. Carpino. 2015. 'Protection from systemic *Candida albicans* infection by inactivation of the Sts phosphatases', *Infect Immun*, 83: 637-45.
- Nathan, C. 2006. 'Neutrophils and immunity: challenges and opportunities', *Nat Rev Immunol*, 6: 173-82.
- Netea, M.G., G.D. Brown, B.J. Kullberg, and N.A. Gow. 2008. 'An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system', *Nat Rev Microbiol*, 6: 67-78.
- Netea, M.G., K. Gijzen, N. Coolen, I. Verschueren, C. Figdor, et al. 2004. 'Human dendritic cells are less potent at killing *Candida albicans* than both monocytes and macrophages', *Microbes Infect*, 6: 985-9.
- Netea, M.G., L.A. Joosten, J.W. van der Meer, B.J. Kullberg, and F.L. van de Veerdonk. 2015. 'Immune defence against *Candida* fungal infections', *Nat Rev Immunol*, 15: 630-42.
- Netea, M.G., C.A. Van Der Graaf, A.G. Vonk, I. Verschueren, J.W. Van Der Meer, and B.J. Kullberg. 2002. 'The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis', *J Infect Dis*, 185: 1483-9.
- Neumann, A.K., and K. Jacobson. 2010. 'A novel pseudopodial component of the dendritic cell anti-fungal response: the fungipod', *PLoS Pathog*, 6: e1000760.
- Newman, S.L., and A. Holly. 2001. '*Candida albicans* is phagocytosed, killed, and processed for antigen presentation by human dendritic cells', *Infect Immun*, 69: 6813-22.

- Ngo, L.Y., S. Kasahara, D.K. Kumasaka, S.E. Knoblauch, A. Jhingran, and T.M. Hohl. 2014. 'Inflammatory monocytes mediate early and organ-specific innate defense during systemic candidiasis', *J Infect Dis*, 209: 109-19.
- Nickerson, K.W., A.L. Atkin, and J.M. Hornby. 2006. 'Quorum sensing in dimorphic fungi: farnesol and beyond', *Appl Environ Microbiol*, 72: 3805-13.
- Nikawa, H., H. Nishimura, T. Hamada, S. Makihira, and L.P. Samaranayake. 1999. 'Relationship between thigmotropism and Candida biofilm formation in vitro', *Mycopathologia*, 144: 125-29.
- Ning, Y., X. Hu, J. Ling, Y. Du, J. Liu, H. Liu, and Z. Peng. 2013. 'Candida albicans survival and biofilm formation under starvation conditions', *Int Endod J*, 46: 62-70.
- Nobile, C.J., J.E. Nett, D.R. Andes, and A.P. Mitchell. 2006. 'Function of Candida albicans adhesin Hwp1 in biofilm formation', *Eukaryot Cell*, 5: 1604-10.
- Nosek, J., L. Tomaska, A. Rycovska, and H. Fukuhara. 2002. 'Mitochondrial telomeres as molecular markers for identification of the opportunistic yeast pathogen Candida parapsilosis', *J Clin Microbiol*, 40: 1283-9.
- Nucci, M., and E. Anaissie. 2001. 'Revisiting the source of candidemia: skin or gut?', *Clin Infect Dis*, 33: 1959-67.
- Ochman, H., and N.A. Moran. 2001. 'Genes lost and genes found: evolution of bacterial pathogenesis and symbiosis', *Science*, 292: 1096-9.
- Odds, F.C. 2001. *Candida and candidosis*.
- Odds, F.C., A.J. Brown, and N.A. Gow. 2003. 'Antifungal agents: mechanisms of action', *Trends Microbiol*, 11: 272-9.
- Ogura, M., S. Kagami, M. Nakao, M. Kono, Y. Kanetsuna, and T. Hosoya. 2012. 'Fungal granulomatous interstitial nephritis presenting as acute kidney injury diagnosed by renal histology including PCR assay', *Clin Kidney J*, 5: 459-62.
- Ortega, M., F. Marco, A. Soriano, M. Almela, J.A. Martinez, et al. 2011. 'Candida species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008', *J Hosp Infect*, 77: 157-61.
- Oude Lashof, A.M., A. Rothova, J.D. Sobel, M. Ruhnke, P.G. Pappas, et al. 2011. 'Ocular manifestations of candidemia', *Clin Infect Dis*, 53: 262-8.
- Paananen, A., R. Mikkola, T. Sareneva, S. Matikainen, M. Andersson, et al. 2000. 'Inhibition of human NK cell function by valinomycin, a toxin from Streptomyces griseus in indoor air', *Infect Immun*, 68: 165-9.
- Pahar, B., A.A. Lackner, and R.S. Veazey. 2006. 'Intestinal double-positive CD4+CD8+ T cells are highly activated memory cells with an increased capacity to produce cytokines', *Eur J Immunol*, 36: 583-92.
- Pahud, B.A., T.L. Greenhow, B. Piecuch, and P.S. Weinrub. 2009. 'Preterm neonates with candidal brain microabscesses: a case series', *J Perinatol*, 29: 323-6.
- Palige, K., J. Linde, R. Martin, B. Bottcher, F. Citiulo, et al. 2013. 'Global transcriptome sequencing identifies chlamydospore specific markers in Candida albicans and Candida dubliniensis', *PLoS One*, 8: e61940.
- Pampiglione, S., P.E. Manson-Bahr, F. Giungi, G. Giunti, A. Parenti, and G. Canestri Trotti. 1974. 'Studies on Mediterranean leishmaniasis. 2. Asymptomatic cases of visceral leishmaniasis', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 68: 447-53.
- Pankhurst, C.L. 2009. 'Candidiasis (oropharyngeal)', *BMJ Clin Evid*, 2009.
- Papon, N., V. Courdavault, M. Clastre, and R.J. Bennett. 2013. 'Emerging and emerged pathogenic Candida species: beyond the Candida albicans paradigm', *PLoS Pathog*, 9: e1003550.

- Pappas, P.G., B.D. Alexander, D.R. Andes, S. Hadley, C.A. Kauffman, et al. 2010. 'Invasive fungal infections among organ transplant recipients: results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET)', *Clin Infect Dis*, 50: 1101-11.
- Pappas, P.G., C.A. Kauffman, D. Andes, D.K. Benjamin, Jr., T.F. Calandra, et al. 2009. 'Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America', *Clin Infect Dis*, 48: 503-35.
- Parel, Y., M. Aurrand-Lions, A. Scheja, J.M. Dayer, E. Roosnek, and C. Chizzolini. 2007. 'Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis', *Arthritis Rheum*, 56: 3459-67.
- Parel, Y., and C. Chizzolini. 2004. 'CD4+ CD8+ double positive (DP) T cells in health and disease', *Autoimmun Rev*, 3: 215-20.
- Patuwo, C., K. Young, M. Lin, V. Pardi, and R.M. Murata. 2015. 'The changing role of HIV-associated oral candidiasis in the era of HAART', *J Calif Dent Assoc*, 43: 87-92.
- Paugam, A., M.T. Baixench, and C. Viguie. 2008. '[An update on *Candida dubliniensis*]', *Med Mal Infect*, 38: 1-7.
- Paulovicova, E., E. Machova, J. Tulinska, and S. Bystricky. 2007. 'Cell and antibody mediated immunity induced by vaccination with novel *Candida dubliniensis* mannan immunogenic conjugate', *Int Immunopharmacol*, 7: 1325-33.
- Pearce, E.J., and A.S. MacDonald. 2002. 'The immunobiology of schistosomiasis', *Nat Rev Immunol*, 2: 499-511.
- Peleg, A.Y., D.A. Hogan, and E. Mylonakis. 2010. 'Medically important bacterial-fungal interactions', *Nat Rev Microbiol*, 8: 340-9.
- Perlroth, J., B. Choi, and B. Spellberg. 2007. 'Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment', *Med Mycol*, 45: 321-46.
- Petti, S., and G. Tarsitani. 1998. 'Intra-individual variations of salivary microbial levels in young adults', *Eur J Oral Sci*, 106: 616-22.
- Pfaller, M.A., and D.J. Diekema. 2007. 'Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem', *Clin Microbiol Rev*, 20: 133-63.
- Pfaller, M.A., A. Espinel-Ingroff, E. Canton, M. Castanheira, M. Cuenca-Estrella, et al. 2012. 'Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for amphotericin B, flucytosine, and itraconazole and *Candida* spp. as determined by CLSI broth microdilution', *J Clin Microbiol*, 50: 2040-6.
- Pfaller, M.A., S.A. Messer, L. Boyken, R.J. Hollis, C. Rice, S. Tendolkar, and D.J. Diekema. 2004. 'In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS global antifungal surveillance program', *Diagn Microbiol Infect Dis*, 48: 201-5.
- Pfaller, M.A., S.A. Messer, G.J. Moet, R.N. Jones, and M. Castanheira. 2011. 'Candida bloodstream infections: comparison of species distribution and resistance to echinocandin and azole antifungal agents in Intensive Care Unit (ICU) and non-ICU settings in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008-2009)', *Int J Antimicrob Agents*, 38: 65-9.
- Phan, Q.T., C.L. Myers, Y. Fu, D.C. Sheppard, M.R. Yeaman, et al. 2007. 'Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells', *PLoS Biol*, 5: e64.

- Pierce, J.V., D. Dignard, M. Whiteway, and C.A. Kumamoto. 2013. 'Normal adaptation of *Candida albicans* to the murine gastrointestinal tract requires Efg1p-dependent regulation of metabolic and host defense genes', *Eukaryot Cell*, 12: 37-49.
- Pillay, J., I. den Braber, N. Vrisekoop, L.M. Kwast, R.J. de Boer, et al. 2010. 'In vivo labeling with ²H₂O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days', *Blood*, 116: 625-7.
- Plantefève, G., D. Chosidow, and H. Dupont. 2004. 'Yeast peritonitis', *Réanimation*, 13: 205-15.
- Polke, M., B. Hube, and I.D. Jacobsen. 2015. 'Candida survival strategies', *Adv Appl Microbiol*, 91: 139-235.
- Porman, A.M., M.P. Hirakawa, S.K. Jones, N. Wang, and R.J. Bennett. 2013. 'MTL-independent phenotypic switching in *Candida tropicalis* and a dual role for Wor1 in regulating switching and filamentation', *PLoS Genet*, 9: e1003369.
- Porrozzzi, R., M.S. Pereira, A. Teva, A.C. Volpini, M.A. Pinto, et al. 2006. 'Leishmania infantum-induced primary and challenge infections in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*): a primate model for visceral leishmaniasis', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100: 926-37.
- Puel, A., S. Cypowyj, J. Bustamante, J.F. Wright, L. Liu, et al. 2011. 'Chronic mucocutaneous candidiasis in humans with inborn errors of interleukin-17 immunity', *Science*, 332: 65-8.
- Puel, A., S. Cypowyj, L. Marodi, L. Abel, C. Picard, and J.L. Casanova. 2012. 'Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis', *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 12: 616-22.
- Pujol, C., K.J. Daniels, S.R. Lockhart, T. Srikantha, J.B. Radke, J. Geiger, and D.R. Soll. 2004. 'The closely related species *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* can mate', *Eukaryot Cell*, 3: 1015-27.
- Qian, Q., M.A. Jutila, N. Van Rooijen, and J.E. Cutler. 1994. 'Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis', *J Immunol*, 152: 5000-8.
- Quimby, K., E.A. Lilly, M. Zacharek, K. McNulty, J.E. Leigh, J.E. Vazquez, and P.L. Fidel, Jr. 2012. 'CD8 T cells and E-cadherin in host responses against oropharyngeal candidiasis', *Oral Dis*, 18: 153-61.
- Quintin, J., J. Voigt, R. van der Voort, I.D. Jacobsen, I. Verschueren, et al. 2014. 'Differential role of NK cells against *Candida albicans* infection in immunocompetent or immunocompromised mice', *Eur J Immunol*, 44: 2405-14.
- Ramakrishnan, L. 2012. 'Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis', *Nat Rev Immunol*, 12: 352-66.
- Ramirez-Ortiz, Z.G., and T.K. Means. 2012. 'The role of dendritic cells in the innate recognition of pathogenic fungi (*A. fumigatus*, *C. neoformans* and *C. albicans*)', *Virulence*, 3: 635-46.
- Rammaert, B., A. Desjardins, and O. Lortholary. 2012. 'New insights into hepatosplenic candidosis, a manifestation of chronic disseminated candidosis', *Mycoses*, 55: e74-84.
- Reeves, E.P., H. Lu, H.L. Jacobs, C.G. Messina, S. Bolsover, et al. 2002. 'Killing activity of neutrophils is mediated through activation of proteases by K⁺ flux', *Nature*, 416: 291-7.
- Reizis, B., A. Bunin, H.S. Ghosh, K.L. Lewis, and V. Sisirak. 2011. 'Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions', *Annu Rev Immunol*, 29: 163-83.
- Richardson, J.P., and D.L. Moyes. 2015. 'Adaptive immune responses to *Candida albicans* infection', *Virulence*, 6: 327-37.

- Ridley, M.J., and D.S. Ridley. 1986. 'Monocyte recruitment, antigen degradation and localization in cutaneous leishmaniasis', *Br J Exp Pathol*, 67: 209-18.
- Rodrigues, C.F., S. Silva, and M. Henriques. 2014. 'Candida glabrata: a review of its features and resistance', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 33: 673-88.
- Roilides, E., A. Holmes, C. Blake, P.A. Pizzo, and T.J. Walsh. 1995. 'Effects of granulocyte colony-stimulating factor and interferon-gamma on antifungal activity of human polymorphonuclear neutrophils against pseudohyphae of different medically important Candida species', *J Leukoc Biol*, 57: 651-6.
- Roilides, E., T. Sein, R. Schauffele, S.J. Chanock, and T.J. Walsh. 1998. 'Increased serum concentrations of interleukin-10 in patients with hepatosplenic candidiasis', *J Infect Dis*, 178: 589-92.
- Romani, L. 1999. 'Immunity to Candida albicans: Th1, Th2 cells and beyond', *Curr Opin Microbiol*, 2: 363-7.
- Romani, L. 2004. 'Immunity to fungal infections', *Nat Rev Immunol*, 4: 1-23.
- Romani, L. 2011. 'Immunity to fungal infections', *Nat Rev Immunol*, 11: 275-88.
- Romani, L., A. Mencacci, E. Cenci, G. Del Sero, F. Bistoni, and P. Puccetti. 1997. 'An immunoregulatory role for neutrophils in CD4+ T helper subset selection in mice with candidiasis', *J Immunol*, 158: 2356-62.
- Romani, L., A. Mencacci, E. Cenci, R. Spaccapelo, E. Schiaffella, et al. 1993. 'Natural killer cells do not play a dominant role in CD4+ subset differentiation in Candida albicans-infected mice', *Infect Immun*, 61: 3769-74.
- Romani, L., C. Montagnoli, S. Bozza, K. Perruccio, A. Spreca, et al. 2004. 'The exploitation of distinct recognition receptors in dendritic cells determines the full range of host immune relationships with Candida albicans', *Int Immunol*, 16: 149-61.
- Romani, L., T. Zelante, M. Palmieri, V. Napolioni, M. Picciolini, et al. 2015. 'The cross-talk between opportunistic fungi and the mammalian host via microbiota's metabolism', *Semin Immunopathol*, 37: 163-71.
- Rossoni, R.D., J.O. Barbosa, S.F. Vilela, A.O. Jorge, and J.C. Junqueira. 2013. 'Comparison of the hemolytic activity between C. albicans and non-albicans Candida species', *Braz Oral Res*, 27: 484-9.
- Roy, R.M., and B.S. Klein. 2012. 'Dendritic cells in antifungal immunity and vaccine design', *Cell Host Microbe*, 11: 436-46.
- Ruiz-Herrera, J., M.V. Elorza, E. Valentin, and R. Sentandreu. 2006. 'Molecular organization of the cell wall of Candida albicans and its relation to pathogenicity', *FEMS Yeast Res*, 6: 14-29.
- Sabatelli, F., R. Patel, P.A. Mann, C.A. Mendrick, C.C. Norris, et al. 2006. 'In vitro activities of posaconazole, fluconazole, itraconazole, voriconazole, and amphotericin B against a large collection of clinically important molds and yeasts', *Antimicrob Agents Chemother*, 50: 2009-15.
- Saijo, S., S. Ikeda, K. Yamabe, S. Kakuta, H. Ishigame, et al. 2010. 'Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against Candida albicans', *Immunity*, 32: 681-91.
- Sanchez, M.A., N.L. Diaz, O. Zerpa, E. Negron, J. Convit, and F.J. Tapia. 2004. 'Organ-specific immunity in canine visceral leishmaniasis: analysis of symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected with Leishmania chagasi', *Am J Trop Med Hyg*, 70: 618-24.
- Sandilands, G.P., Z. Ahmed, N. Perry, M. Davison, A. Lupton, and B. Young. 2005. 'Cross-linking of neutrophil CD11b results in rapid cell surface expression of molecules

- required for antigen presentation and T-cell activation', *Immunology*, 114: 354-68.
- Sandini, S., R. La Valle, S. Deaglio, F. Malavasi, A. Cassone, and F. De Bernardis. 2011. 'A highly immunogenic recombinant and truncated protein of the secreted aspartic proteases family (rSap2t) of *Candida albicans* as a mucosal anticandidal vaccine', *FEMS Immunol Med Microbiol*, 62: 215-24.
- Sanglard, D., A. Coste, and S. Ferrari. 2009. 'Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation', *FEMS Yeast Res*, 9: 1029-50.
- Sanglard, D., and F.C. Odds. 2002. 'Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences', *Lancet Infect Dis*, 2: 73-85.
- Sasse, C., M. Hasenberg, M. Weyler, M. Gunzer, and J. Morschhauser. 2013. 'White-opaque switching of *Candida albicans* allows immune evasion in an environment-dependent fashion', *Eukaryot Cell*, 12: 50-8.
- Scapini, P., J.A. Lapinet-Vera, S. Gasperini, F. Calzetti, F. Bazzoni, and M.A. Cassatella. 2000. 'The neutrophil as a cellular source of chemokines', *Immunol Rev*, 177: 195-203.
- Seddiki, S.M., Z. Boucherit-Otmani, K. Boucherit, S. Badsı-Amir, M. Taleb, and D. Kunkel. 2013. 'Assessment of the types of catheter infectivity caused by *Candida* species and their biofilm formation. First study in an intensive care unit in Algeria', *Int J Gen Med*, 6: 1-7.
- Seider, K., S. Brunke, L. Schild, N. Jablonowski, D. Wilson, et al. 2011. 'The facultative intracellular pathogen *Candida glabrata* subverts macrophage cytokine production and phagolysosome maturation', *J Immunol*, 187: 3072-86.
- Seider, K., F. Gerwien, L. Kasper, S. Allert, S. Brunke, et al. 2014. 'Immune evasion, stress resistance, and efficient nutrient acquisition are crucial for intracellular survival of *Candida glabrata* within macrophages', *Eukaryot Cell*, 13: 170-83.
- Shareck, J., and P. Belhumeur. 2011. 'Modulation of morphogenesis in *Candida albicans* by various small molecules', *Eukaryot Cell*, 10: 1004-12.
- Sharkey, L.L., M.D. McNemar, S.M. Saporito-Irwin, P.S. Sypherd, and W.A. Fonzi. 1999. 'HWP1 functions in the morphological development of *Candida albicans* downstream of EFG1, TUP1, and RBF1', *J Bacteriol*, 181: 5273-9.
- Sherry, L., R. Rajendran, D.F. Lappin, E. Borghi, F. Perdoni, et al. 2014. 'Biofilms formed by *Candida albicans* bloodstream isolates display phenotypic and transcriptional heterogeneity that are associated with resistance and pathogenicity', *BMC Microbiol*, 14: 182.
- Sherwood, J., N.A. Gow, G.W. Gooday, D.W. Gregory, and D. Marshall. 1992. 'Contact sensing in *Candida albicans*: a possible aid to epithelial penetration', *J Med Vet Mycol*, 30: 461-9.
- Shibuya, K., A. Hirata, J. Omuta, M. Sugamata, S. Katori, et al. 2005. 'Granuloma and cryptococcosis', *J Infect Chemother*, 11: 115-22.
- Si, H., A.D. Hernday, M.P. Hirakawa, A.D. Johnson, and R.J. Bennett. 2013. '*Candida albicans* white and opaque cells undergo distinct programs of filamentous growth', *PLoS Pathog*, 9: e1003210.
- Silva, M.T. 2010. 'Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens', *J Leukoc Biol*, 87: 805-13.
- Silva, N.C., J.M. Nery, and A.L. Dias. 2014. 'Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance', *Mycoses*, 57: 1-11.

- Silva, S., M. Henriques, R. Oliveira, D. Williams, and J. Azeredo. 2010. 'In vitro biofilm activity of non-Candida albicans Candida species', *Curr Microbiol*, 61: 534-40.
- Silva, S., M. Negri, M. Henriques, R. Oliveira, D.W. Williams, and J. Azeredo. 2011. 'Adherence and biofilm formation of non-Candida albicans Candida species', *Trends Microbiol*, 19: 241-7.
- Skinner, C.E. 1947. 'The Yeast-Like Fungi: Candida and Brettanomyces', *Bacteriol Rev*, 11: 227-74.
- Smyth, M.J., E. Cretney, J.M. Kelly, J.A. Westwood, S.E. Street, et al. 2005. 'Activation of NK cell cytotoxicity', *Mol Immunol*, 42: 501-10.
- Sobel, J.D. 2007. 'Vulvovaginal candidosis', *Lancet*, 369: 1961-71.
- Soll, D.R. 1992. 'High-frequency switching in Candida albicans', *Clin Microbiol Rev*, 5: 183-203.
- Soll, D.R. 2014. 'The role of phenotypic switching in the basic biology and pathogenesis of Candida albicans', *J Oral Microbiol*, 6.
- Soltész, B., B. Toth, A.K. Sarkadi, M. Erdos, and L. Marodi. 2015. 'The Evolving View of IL-17-Mediated Immunity in Defense Against Mucocutaneous Candidiasis in Humans', *Int Rev Immunol*, 34: 348-63.
- Song, Z., N. Papanicolaou, S. Dean, and Z. Bing. 2012. 'Localized candidiasis in kidney presented as a mass mimicking renal cell carcinoma', *Case Rep Infect Dis*, 2012: 953590.
- Sovaila, S., C. Rivoisy, and A. Bourgarit. 2015. 'Le syndrome inflammatoire de reconstitution immunitaire : plusieurs visages pour le même syndrome', *mt*, 21: 8-18.
- Spellberg, B.J., M. Collins, S.W. French, J.E. Edwards, Jr., Y. Fu, and A.S. Ibrahim. 2005. 'A phagocytic cell line markedly improves survival of infected neutropenic mice', *J Leukoc Biol*, 78: 338-44.
- Spits, H., D. Artis, M. Colonna, A. Diefenbach, J.P. Di Santo, et al. 2013. 'Innate lymphoid cells--a proposal for uniform nomenclature', *Nat Rev Immunol*, 13: 145-9.
- Staab, J.F., S.D. Bradway, P.L. Fidel, and P. Sundstrom. 1999. 'Adhesive and mammalian transglutaminase substrate properties of Candida albicans Hwp1', *Science*, 283: 1535-8.
- Stehr, F., M. Kretschmar, C. Kröger, B. Hube, and W. Schäfer. 2003. 'Microbial lipases as virulence factors', *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 22: 347-55.
- Steinman, R.M. 2012. 'Decisions about dendritic cells: past, present, and future', *Annu Rev Immunol*, 30: 1-22.
- Su, C., Y. Lu, and H. Liu. 2013. 'Reduced TOR signaling sustains hyphal development in Candida albicans by lowering Hog1 basal activity', *Mol Biol Cell*, 24: 385-97.
- Subbian, S., L. Tsenova, M.J. Kim, H.C. Wainwright, A. Visser, et al. 2015. 'Lesion-Specific Immune Response in Granulomas of Patients with Pulmonary Tuberculosis: A Pilot Study', *PLoS One*, 10: e0132249.
- Sudbery, P., N. Gow, and J. Berman. 2004. 'The distinct morphogenic states of Candida albicans', *Trends Microbiol*, 12: 317-24.
- Sudbery, P.E. 2011. 'Growth of Candida albicans hyphae', *Nat Rev Microbiol*, 9: 737-48.
- Sullivan, D.J., T.J. Westerneng, K.A. Haynes, D.E. Bennett, and D.C. Coleman. 1995. 'Candida dubliniensis sp. nov.: phenotypic and molecular characterization of a novel species associated with oral candidosis in HIV-infected individuals', *Microbiology*, 141 (Pt 7): 1507-21.

- Svobodova, E., P. Staib, J. Losse, F. Hennicke, D. Barz, and M. Jozsi. 2012. 'Differential interaction of the two related fungal species *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* with human neutrophils', *J Immunol*, 189: 2502-11.
- Swidergall, M., and J.F. Ernst. 2014. 'Interplay between *Candida albicans* and the antimicrobial peptide armory', *Eukaryot Cell*, 13: 950-7.
- Szabo, E.K., and D.M. MacCallum. 2011. 'The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis', *FEMS Microbiol Lett*, 320: 1-8.
- Tadec, L., J.P. Talarmin, T. Gastinne, C. Bretonniere, M. Miegerville, P. Le Pape, and F. Morio. 2016. 'Epidemiology, risk factor, species distribution, antifungal resistance and outcome of Candidemia at a single French hospital: a 7-year study', *Mycoses*, 59: 296-303.
- Talpaert, M.J., A. Balfour, S. Stevens, M. Baker, F.A. Muhlschlegel, and C.W. Gourlay. 2015. 'Candida biofilm formation on voice prostheses', *J Med Microbiol*, 64: 199-208.
- Tavanti, A., A.D. Davidson, N.A. Gow, M.C. Maiden, and F.C. Odds. 2005. 'Candida orthopsilosis and *Candida metapsilosis* spp. nov. to replace *Candida parapsilosis* groups II and III', *J Clin Microbiol*, 43: 284-92.
- Taylor, P.R., S. Roy, S.M. Leal, Jr., Y. Sun, S.J. Howell, et al. 2014. 'Activation of neutrophils by autocrine IL-17A-IL-17RC interactions during fungal infection is regulated by IL-6, IL-23, ROR γ and dectin-2', *Nat Immunol*, 15: 143-51.
- Therby, A., B. Dupont, and O. Lortholary. 2004. 'Update on histoplasmosis caused by *Histoplasma capsulatum* var. *capsulatum*', *La Lettre de l'Infectiologie*, Tome XIX: 53-60.
- Thind, S.K., C.P. Taborda, and J.D. Nosanchuk. 2015. 'Dendritic cell interactions with *Histoplasma* and *Paracoccidioides*', *Virulence*, 6: 424-32.
- Thompson, D.S., P.L. Carlisle, and D. Kadosh. 2011. 'Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species', *Eukaryot Cell*, 10: 1173-82.
- Tillmann, A., N.A. Gow, and A.J. Brown. 2011. 'Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in yeast', *Biochem Soc Trans*, 39: 219-23.
- Torda, A., R.K. Kumar, and P.D. Jones. 2001. 'The pathology of human and murine pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*', *Pathology*, 33: 475-8.
- Torosantucci, A., C. Bromuro, P. Chiani, F. De Bernardis, F. Berti, et al. 2005. 'A novel glyco-conjugate vaccine against fungal pathogens', *J Exp Med*, 202: 597-606.
- Torosantucci, A., P. Chiani, C. Bromuro, F. De Bernardis, A.S. Palma, et al. 2009. 'Protection by anti-beta-glucan antibodies is associated with restricted beta-1,3 glucan binding specificity and inhibition of fungal growth and adherence', *PLoS One*, 4: e5392.
- Torrado, E., and A.M. Cooper. 2010. 'IL-17 and Th17 cells in tuberculosis', *Cytokine Growth Factor Rev*, 21: 455-62.
- Toth, A., K. Csonka, C. Jacobs, C. Vagvolgyi, J.D. Nosanchuk, M.G. Netea, and A. Gacser. 2013. '*Candida albicans* and *Candida parapsilosis* induce different T-cell responses in human peripheral blood mononuclear cells', *J Infect Dis*, 208: 690-8.
- Toth, R., M.F. Alonso, J.M. Bain, C. Vagvolgyi, L.P. Erwig, and A. Gacser. 2015. 'Different *Candida parapsilosis* clinical isolates and lipase deficient strain trigger an altered cellular immune response', *Front Microbiol*, 6: 1102.
- Toth, R., A. Toth, C. Papp, F. Jankovics, C. Vagvolgyi, et al. 2014. 'Kinetic studies of *Candida parapsilosis* phagocytosis by macrophages and detection of intracellular survival mechanisms', *Front Microbiol*, 5: 633.

- Tramsen, L., O. Beck, F.R. Schuster, K.P. Hunfeld, J.P. Latge, et al. 2007. 'Generation and characterization of anti-Candida T cells as potential immunotherapy in patients with Candida infection after allogeneic hematopoietic stem-cell transplant', *J Infect Dis*, 196: 485-92.
- Trinel, P.A., F. Delplace, E. Maes, J.P. Zanetta, C. Mille, et al. 2005. 'Candida albicans serotype B strains synthesize a serotype-specific phospholipomannan overexpressing a beta-1,2-linked mannotriose', *Mol Microbiol*, 58: 984-98.
- Tumbarello, M., E. Tacconelli, K. de Gaetano Donati, G. Morace, G. Fadda, and R. Cauda. 1999. 'Candidemia in HIV-infected subjects', *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 18: 478-83.
- Turner, J.D., P. Narang, M.C. Coles, and A.P. Mountford. 2012. 'Blood flukes exploit Peyer's Patch lymphoid tissue to facilitate transmission from the mammalian host', *PLoS Pathog*, 8: e1003063.
- Urban, C.F., D. Ermert, M. Schmid, U. Abu-Abed, C. Goosmann, et al. 2009. 'Neutrophil extracellular traps contain calprotectin, a cytosolic protein complex involved in host defense against Candida albicans', *PLoS Pathog*, 5: e1000639.
- Urban, C.F., U. Reichard, V. Brinkmann, and A. Zychlinsky. 2006. 'Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms', *Cell Microbiol*, 8: 668-76.
- Uwamahoro, N., J. Verma-Gaur, H.H. Shen, Y. Qu, R. Lewis, et al. 2014. 'The pathogen Candida albicans hijacks pyroptosis for escape from macrophages', *MBio*, 5: e00003-14.
- Valteau-Couanet, D., C. Leboulleire, K. Maincent, M. Tournier, O. Hartmann, et al. 2002. 'Dendritic cells for NK/LAK activation: rationale for multicellular immunotherapy in neuroblastoma patients', *Blood*, 100: 2554-61.
- van Bruggen, R., A. Drewniak, M. Jansen, M. van Houdt, D. Roos, et al. 2009. 'Complement receptor 3, not Dectin-1, is the major receptor on human neutrophils for beta-glucan-bearing particles', *Mol Immunol*, 47: 575-81.
- van de Veerdonk, F.L., R.J. Marijnissen, B.J. Kullberg, H.J. Koenen, S.C. Cheng, et al. 2009. 'The macrophage mannose receptor induces IL-17 in response to Candida albicans', *Cell Host Microbe*, 5: 329-40.
- van de Veerdonk, F.L., T.S. Plantinga, A. Hoischen, S.P. Smeekens, L.A. Joosten, et al. 2011. 'STAT1 mutations in autosomal dominant chronic mucocutaneous candidiasis', *N Engl J Med*, 365: 54-61.
- van der Graaf, C.A., M.G. Netea, I. Verschuere, J.W. van der Meer, and B.J. Kullberg. 2005. 'Differential cytokine production and Toll-like receptor signaling pathways by Candida albicans blastoconidia and hyphae', *Infect Immun*, 73: 7458-64.
- van Dommelen, S.L., N. Sumaria, R.D. Schreiber, A.A. Scalzo, M.J. Smyth, and M.A. Degli-Esposti. 2006. 'Perforin and granzymes have distinct roles in defensive immunity and immunopathology', *Immunity*, 25: 835-48.
- Vermes, A., H.J. Guchelaar, and J. Dankert. 2000. 'Flucytosine: a review of its pharmacology, clinical indications, pharmacokinetics, toxicity and drug interactions', *J Antimicrob Chemother*, 46: 171-9.
- Vincent, J.L., J. Rello, J. Marshall, E. Silva, A. Anzueto, et al. 2009. 'International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units', *JAMA*, 302: 2323-9.
- Voigt, J., K. Hunniger, M. Bouzani, I.D. Jacobsen, D. Barz, et al. 2014. 'Human natural killer cells acting as phagocytes against Candida albicans and mounting an

- inflammatory response that modulates neutrophil antifungal activity', *J Infect Dis*, 209: 616-26.
- von Eiff, M., M. Essink, N. Roos, W. Hiddemann, T. Buchner, and J. van de Loo. 1990. 'Hepatosplenic candidiasis, a late manifestation of *Candida septicaemia* in neutropenic patients with haematologic malignancies', *Blut*, 60: 242-8.
- Vylkova, S., and M.C. Lorenz. 2014. 'Modulation of phagosomal pH by *Candida albicans* promotes hyphal morphogenesis and requires Stp2p, a regulator of amino acid transport', *PLoS Pathog*, 10: e1003995.
- Wagener, J., R.K. Malireddi, M.D. Lenardon, M. Koberle, S. Vautier, et al. 2014. 'Fungal chitin dampens inflammation through IL-10 induction mediated by NOD2 and TLR9 activation', *PLoS Pathog*, 10: e1004050.
- Wang, K., X. Fang, N. Ma, Q. Lin, Z. Huang, et al. 2015. 'Myeloperoxidase-deficient zebrafish show an augmented inflammatory response to challenge with *Candida albicans*', *Fish Shellfish Immunol*, 44: 109-16.
- Wang, Y.C., C. Lin, M.T. Chuang, W.P. Hsieh, C.Y. Lan, Y.J. Chuang, and B.S. Chen. 2013. 'Interspecies protein-protein interaction network construction for characterization of host-pathogen interactions: a *Candida albicans*-zebrafish interaction study', *BMC Syst Biol*, 7: 79.
- Watanabe, H., M. Azuma, K. Igarashi, and H. Ooshima. 2005. 'Analysis of chitin at the hyphal tip of *Candida albicans* using calcofluor white', *Biosci Biotechnol Biochem*, 69: 1798-801.
- Watanabe, T., M. Takano, M. Murakami, H. Tanaka, A. Matsuhisa, et al. 1999. 'Characterization of a haemolytic factor from *Candida albicans*', *Microbiology*, 145 (Pt 3): 689-94.
- Waters, J.P., J.S. Pober, and J.R. Bradley. 2013. 'Tumour necrosis factor in infectious disease', *J Pathol*, 230: 132-47.
- Wellington, M., J.M. Bliss, and C.G. Haidaris. 2003. 'Enhanced phagocytosis of *Candida* species mediated by opsonization with a recombinant human antibody single-chain variable fragment', *Infect Immun*, 71: 7228-31.
- Wells, C.A., J.A. Salvage-Jones, X. Li, K. Hitchens, S. Butcher, et al. 2008. 'The macrophage-inducible C-type lectin, mincle, is an essential component of the innate immune response to *Candida albicans*', *J Immunol*, 180: 7404-13.
- Whibley, N., J.R. Jaycox, D. Reid, A.V. Garg, J.A. Taylor, et al. 2015. 'Delinking CARD9 and IL-17: CARD9 Protects against *Candida tropicalis* Infection through a TNF-alpha-Dependent, IL-17-Independent Mechanism', *J Immunol*, 195: 3781-92.
- Whitney, P.G., E. Bar, F. Osorio, N.C. Rogers, B.U. Schraml, et al. 2014. 'Syk signaling in dendritic cells orchestrates innate resistance to systemic fungal infection', *PLoS Pathog*, 10: e1004276.
- WHO. 2015. 'Schistosomiasis: number of people treated worldwide in 2013', *Wkly Epidemiol Rec*, 90: 25-32.
- WHO. 2016. "Global Tuberculosis Report 2016." In. : World Health Organization.
- Williams, P. 2007. 'Quorum sensing, communication and cross-kingdom signalling in the bacterial world', *Microbiology*, 153: 3923-38.
- Wilson, D., S. Thewes, K. Zakikhany, C. Fradin, A. Albrecht, et al. 2009. 'Identifying infection-associated genes of *Candida albicans* in the postgenomic era', *FEMS Yeast Res*, 9: 688-700.
- Woods, J.P. 2003. 'Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis', *Curr Opin Microbiol*, 6: 327-31.

- Xiujiao, X., and X. Ai'e. 2005. 'Two cases of cutaneous cryptococcosis', *Mycoses*, 48: 238-41.
- Yang, M., A. Brand, T. Srikantha, K.J. Daniels, D.R. Soll, and N.A. Gow. 2011. 'Fig1 facilitates calcium influx and localizes to membranes destined to undergo fusion during mating in *Candida albicans*', *Eukaryot Cell*, 10: 435-44.
- Yapar, N. 2014. 'Epidemiology and risk factors for invasive candidiasis', *Ther Clin Risk Manag*, 10: 95-105.
- Yu, Q., H. Wang, X. Cheng, N. Xu, X. Ding, L. Xing, and M. Li. 2012. 'Roles of Cch1 and Mid1 in morphogenesis, oxidative stress response and virulence in *Candida albicans*', *Mycopathologia*, 174: 359-69.
- Yumoto, E., T. Sanuki, S. Miyamaru, and Y. Kumai. 2008. 'Does subepithelial hemorrhage cause persistence of laryngeal granuloma?', *Laryngoscope*, 118: 932-7.
- Zajac-Spychala, O., B. Ukielska, K. Jonczyk-Potoczna, B. Konatkowska, and J. Wachowiak. 2016. 'Chronic Disseminated Candidiasis Complicated by Immune Reconstitution Inflammatory Syndrome in Child with Acute Lymphoblastic Leukemia', *Case Rep Hematol*, 2016: 5960150.
- Zerbe, C.S., and S.M. Holland. 2005. 'Disseminated histoplasmosis in persons with interferon-gamma receptor 1 deficiency', *Clin Infect Dis*, 41: e38-41.
- Zheng, N.X., Y. Wang, D.D. Hu, L. Yan, and Y.Y. Jiang. 2015. 'The role of pattern recognition receptors in the innate recognition of *Candida albicans*', *Virulence*, 6: 347-61.
- Zhu, L.L., X.Q. Zhao, C. Jiang, Y. You, X.P. Chen, et al. 2013. 'C-type lectin receptors Dectin-3 and Dectin-2 form a heterodimeric pattern-recognition receptor for host defense against fungal infection', *Immunity*, 39: 324-34.
- Zijlstra, E.E., and A.M. el-Hassan. 2001. 'Leishmaniasis in Sudan. Post kala-azar dermal leishmaniasis', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95 Suppl 1: S59-76.
- Zucchini, N., K. Crozat, T. Baranek, S.H. Robbins, M. Altfeld, and M. Dalod. 2008. 'Natural killer cells in immunodefense against infective agents', *Expert Rev Anti Infect Ther*, 6: 867-85.
- Zuckermann, F.A. 1999. 'Extrathymic CD4/CD8 double positive T cells', *Vet Immunol Immunopathol*, 72: 55-66.

Thèse de Doctorat

Barbara MISME-AUCOUTURIER

Le granulome à *Candida* : modèle de persistance pour l'étude de l'interaction hôte-pathogène

Candida granuloma: persistence model for the study of host-pathogen interaction

Résumé

Les levures du genre *Candida*, champignons microscopiques saprophytes de l'Homme, peuvent par leur caractère opportuniste causer des pathologies appelées candidoses. Dans le cadre des candidoses chroniques, il existe deux principaux types d'infections : les candidoses disséminées chroniques (CDC) ou hépatospléniques et les candidoses cutané-muqueuses chroniques (CMCD). Dans ces deux entités cliniques, la présence de granulomes a été mise en évidence mais leur rôle dans la physiopathologie est encore peu étudié. En utilisant un modèle humain *in vitro* de granulome fongique à *Candida*, nous avons caractérisé la réponse granulomateuse de sujets sains immunocompétents lors de l'infection par 8 espèces de *Candida* rencontrées en clinique (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* et *C. kefyr*). Différents paramètres ont été étudiés : le nombre, la taille et la cinétique de formation des granulomes, l'évolution de la charge fongique selon les espèces, ainsi que la nature des cellules immunitaires impliquées dans la formation du granulome et la cinétique de production de cytokines. Différents profils de réponse ont été mis en évidence dont des individus qui ne contrôlent pas l'infection (persistance du pathogène) et d'autres pour lesquels il y a clairance de *Candida* au sein des granulomes. Nous avons pour la première fois mis en évidence une proportion plus importante de cellules T doubles positives CD4^{lo}CD8^{hi} dans les granulomes où l'infection persiste. Enfin, une variabilité inter et intra-individuelle dans la réponse granulomateuse et dans l'issue de l'infection elle-même a été mise en évidence.

Mots clés

Candida spp., granulome, interactions hôte-pathogène, persistance, réponse immune

Abstract

Candida species, microscopic and saprophytic human fungus, can by their opportunist character cause pathologies called candidiasis. In the framework of the chronic candidiasis, there are two main types of *Candida* infections: chronic disseminated candidiasis (CDC) or hepatosplenic candidiasis and chronic mucocutaneous candidiasis (CMC). During these two clinical manifestations, the presence of granulomas was highlighted but their role in physiopathology is remains poorly documented. Using *in vitro* model of human *Candida* granuloma, we characterized the granulomateuse response of immunocompetent healthy subjects during infection by 8 clinically relevant *Candida* species (*C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* and *C. kefyr*). Various parameters were followed: number, size and kinetics of granulomas formation, fungal burden evolution according to species, so the nature of immune cells involved in granulomas formation and the cytokines production. Different responses profiles were highlighted: individuals who not control infection (persistence of the pathogen) and others for which there's *Candida* clearance within granulomas. For the first time, we highlighted a more important proportion of T cells CD4^{lo}CD8^{hi} doubly positive in persistent infection granulomas. Finally, inter and intra-variability in the granulomatous response as well as the *Candida* infection outcome were showed.

Key Words

Candida spp., granuloma, host-pathogen interactions, persistence, immune response