

COMMUNICATION

Importance des micromycètes dans le microbiote intestinal : le modèle *Candida albicans*.

MOTS-CLÉS : MYCOBIOTE. *CANDIDA ALBICANS*. MUQUEUSE INTESTINALE. JONCTIONS SERRÉES. CELLULES M

Candida albicans: a model organism to study the role of micromycetes in the intestinal microbiota

KEY-WORDS: MYCOBIOTA. *CANDIDA ALBICANS*. INTESTINAL MUCOSA. TIGHT-JUNCTIONS. M CELLS

Alain BONNIN *,**, Frédéric DALLE *,**

RÉSUMÉ

Les champignons microscopiques ou micromycètes représentent une fraction peu abondante du microbiote, identifiée comme le « mycobiote », et estimée à moins de 0.1 % de la biosphère microbienne de l'intestin. Des travaux récents suggèrent que des modifications de la composition du mycobiote jouent un rôle dans la physiopathologie de nombreuses affections dont les maladies inflammatoires de l'intestin. Beaucoup de ces travaux mettent en avant une augmentation de la fréquence de colonisation par Candida spp., et notamment C. albicans, un micromycète présent au niveau de l'intestin chez plus de 50 % des sujets sains. C. albicans est donc un organisme modèle pour comprendre le rôle physiopathologique du mycobiote intestinal. L'épithélium intestinal est la première barrière au cours de l'interaction de C. albicans avec la muqueuse. Dans les conditions normales, les entérocytes n'assurent pas l'internalisation de C. albicans par endocytose, et seule une pénétration active par C. albicans est possible. Nous présentons des résultats montrant que l'endocytose par les entérocytes est restaurée en cas d'altération des jonctions serrées qui ménage un accès au pôle basolatéral des cellules épithéliales intestinales. Nous montrons d'autre part que C. albicans est capable d'utiliser les cellules microfold (ou cellules M), des cellules spécialisées dans l'endocytose de molécules ou de micro-organismes de la lumière intes-

* Univ. Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM, UMR A02-102, F-21000 Dijon.

** Centre Hospitalier Universitaire, Service de Parasitologie Mycologie, 2 rue Angélique Ducoudray, F-21070 Dijon Cedex, France

Tirés-à-part : Professeur Alain BONNIN, même adresse

Article reçu le 24 mai 2018 et accepté le 25 juin 2018

tinale, pour traverser la barrière intestinale in vitro. Ces résultats donnent une base cellulaire aux hypothèses impliquant le mycobiote dans la pathogenèse de l'inflammation intestinale. Ils permettent également de mieux comprendre les mécanismes en jeu à la phase précoce des candidoses systémiques d'origine intestinale.

SUMMARY

Among micro-organisms that inhabit the gut, fungi represent a minor fraction, identified as the mycobiota, and estimated at less than 0.1 % of the entire microbiota. Recent works suggest that modifications of the microbiota are involved in the pathogenesis of multiple diseases, including inflammatory bowel diseases, with increased proportions of Candida spp. and noticeably Candida albicans, a micromycete part of the normal gut flora in more than 50 % of healthy individuals, being reported. Therefore, C. albicans represents a model organism for the analysis of the role of the intestinal mycobiota. The intestinal epithelium is the first barrier during C. albicans interaction with the mucosa. Enterocytes grown in mature differentiated monolayers cannot internalize C. albicans by induced endocytosis, and the only mechanism of penetration into enterocytes is by active penetration of the fungus. In the present paper, we present results showing that endocytosis by enterocytes is restored upon alteration of tight junctions, that provide access to the basolateral side of the cells. We also show that C. albicans is able to use microfold cells (or M cells), a population of epithelial cells specialized in endocytosis of molecules or micro-organisms from the intestinal lumen, to invade the mucosa. These data provide a cellular basis for hypotheses involving the mycobiota in the pathogenesis of gut inflammation. They also contribute to a better understanding of the mechanisms involved at the early stages of invasive candidiasis with an intestinal portal of entry.

INTRODUCTION

La biosphère microbienne qui colonise la muqueuse intestinale est constituée de bactéries, de virus, de champignons microscopiques (ou micromycètes) et de protozoaires. Elle représente 10^{12} à 10^{14} micro-organismes dont l'ensemble forme le microbiote intestinal. Les technologies de séquençage métagénomique permettent une caractérisation précise du microbiote. Ces approches confirment que la composante bactérienne est largement dominante dans le microbiote intestinal global [1]. La fraction du microbiote constituée des champignons microscopiques est identifiée comme le mycobiote [2]. Au niveau de l'intestin, le mycobiote représente moins de 0.1 % du microbiote global. Il est constitué de levures, micromycètes unicellulaires dont les cellules, les blastospores, se multiplient par bourgeonnement, et de micromycètes pluricellulaires se développant sous forme de filaments, ou hyphes, à croissance apicale. La plus large étude du mycobiote intestinal de sujets sains conduite à ce jour a porté sur 147 sujets de la cohorte « Human Microbiome Project » et a montré une prédominance de levures, en particulier de levures appartenant aux genres *Saccharomyces*, *Malassezia* et *Candida* [3].

Un déséquilibre du microbiote intestinal (dysbiose) avec modification de la composition du mycobiote est décrit dans les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) [4, 5], la maladie de Hirschsprung [6], le syndrome du colon

irritable [7], l'adénome colo-rectal [8], la cirrhose alcoolique [9], la réaction du greffon contre l'hôte [10], certaines manifestations atopiques pulmonaires de l'enfant [11], et l'hépatite B [12]. Beaucoup de ces études montrent une augmentation de la prévalence de la colonisation par les levures du genre *Candida*, et notamment par l'espèce *C. albicans*, une levure dimorphique qui présente la particularité biologique de se développer sous forme unicellulaire (blastospores) et sous forme de filaments (hyphes).

C. albicans est un commensal des muqueuses buccale, vaginale et intestinale, présent chez plus de 50 % des sujets bien portants [13]. À l'homéostasie, *C. albicans* est en équilibre avec la barrière épithéliale, la réponse immunitaire de la muqueuse et le microbiote bactérien [14, 15]. Une perturbation de cet équilibre peut provoquer le passage de l'état commensal à l'état pathogène. Chez des patients fragilisés, une forte colonisation intestinale par *C. albicans*, l'altération de la barrière muqueuse et la neutropénie favorisent ainsi la translocation des éléments fongiques à travers la muqueuse intestinale et leur dissémination [13].

L'interaction entre *Candida albicans* et la muqueuse intestinale est donc un modèle privilégié pour étudier le rôle du mycobiote intestinal à l'homéostasie et en situation pathologique. La barrière épithéliale est la première ligne de défense au cours de cette interaction. Les deux formes morphologiques de *C. albicans*, blastospores et filaments, adhèrent aux cellules épithéliales. Mais seule la forme filamenteuse peut pénétrer les cellules [15]. Nous avons montré antérieurement que si *C. albicans* est internalisé dans les cellules épithéliales orales par endocytose par la cellule et pénétration active par *C. albicans*, le seul mécanisme d'internalisation dans les entérocytes est la pénétration active par *C. albicans* [16]. Nous présentons ici des travaux précisant les mécanismes cellulaires d'interaction entre *C. albicans* et la barrière épithéliale intestinale. Ils montrent que l'endocytose par les entérocytes est restaurée et l'internalisation dans les cellules augmentée en cas d'altération des jonctions serrées, qui limitent en temps normal l'accès de *C. albicans* au pôle baso-latéral des entérocytes. D'autre part *C. albicans* apparaît capable de traverser la barrière épithéliale *in vitro* en utilisant les cellules microfold (cellules M), des cellules épithéliales situées en regard des formations lymphoïdes de la muqueuse intestinale, et spécialisées dans l'endocytose de molécules et de micro-organismes.

Les jonctions serrées limitent l'internalisation de *C. albicans* dans les entérocytes à la phase précoce de l'interaction.

L'épithélium intestinal est la première barrière à la pénétration tissulaire des éléments du microbiote. Il est principalement constitué d'entérocytes polarisés et différenciés, reliés entre eux par un complexe jonctionnel fait de jonctions serrées en situation apicale, et de jonctions adhérentes et de desmosomes sous-jacents. Les jonctions serrées sont constituées de protéines transmembranaires (claudines, occludine) reliées par les protéines du groupe ZO (zonula occludens) au cytosquelette d'actine du cortex cellulaire. Cette machinerie moléculaire est fine-

ment régulée. Elle contrôle la perméabilité de l'espace paracellulaire et maintient la polarité des entérocytes en séparant le pôle apical et la face basolatérale [17, 18, 19]. Les jonctions adhérentes et les desmosomes assurent la stabilité mécanique de l'épithélium. Au niveau des jonctions adhérentes la E-cadhérine est le principal composant de l'interaction entre cellules [18].

Les jonctions serrées sont utilisées comme porte d'entrée par de nombreuses bactéries et virus pathogènes [20]. Chez *C. albicans*, l'invasion des entérocytes a lieu au niveau du domaine apical des cellules. Des observations occasionnelles de pénétration au niveau des jonctions inter-cellulaires suggèrent toutefois que *C. albicans* peut envahir l'espace paracellulaire [16]. Au niveau des cellules épithéliales orales, il a été montré que l'endocytose de *C. albicans* est liée à l'interaction de la E-cadhérine avec la protéine Als 3, une adhésine exprimée par la forme filamenteuse de *C. albicans* [21]. Bien que les entérocytes expriment la E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes [18], il n'a pas été observé d'endocytose de *C. albicans* par les entérocytes organisés en monocouche différenciée [16]. La position des jonctions serrées, en situation apicale par rapport aux jonctions adhérentes, et contrôlant par conséquent l'accès à l'espace paracellulaire, peut expliquer l'inaccessibilité de la E. cadhérine et l'absence d'endocytose par les entérocytes en présence de jonctions serrées fonctionnelles.

Pour explorer cette hypothèse, nous avons étudié la pénétration de *C. albicans* à travers une monocouche d'entérocytes à différents stades de maturation des jonctions serrées. Les résultats ont montré une baisse de l'invasion parallèle à la maturation des jonctions serrées (Tableau Ia). Dans un second temps nous avons étudié l'interaction *C. albicans* — cellules avec et sans prétraitement des cellules par la patuline, une mycotoxine qui altère spécifiquement les jonctions serrées. L'invasion est apparue augmentée après exposition à la patuline (Tableau Ib). L'observation en microscopie électronique à balayage de cellules exposées à la patuline a montré des images caractéristiques d'endocytose, suggérant que l'endocytose par les entérocytes est possible en absence de jonctions serrées. Cette hypothèse a été confirmée en étudiant l'interaction *C. albicans* — cellules en présence de cytochalasine D, un inhibiteur de l'endocytose. Dans ces expériences, on constate une baisse significative de l'invasion de *C. albicans* par des entérocytes pré-traités par la patuline (Tableau Ic). Cet ensemble de résultats indique que les jonctions serrées limitent l'invasion de *C. albicans* au niveau de la barrière épithéliale, leur altération restaurant la capacité d'endocytose des entérocytes et augmentant l'internalisation de *C. albicans* [22]. Afin de préciser les partenaires moléculaires en jeu nous avons étudié l'invasion d'un mutant de *C. albicans* présentant une double délétion du gène codant pour Als3 et confirmé que cette adhésine intervient dans l'endocytose de *C. albicans* par les entérocytes en absence de jonctions serrées. En revanche, l'endocytose de *C. albicans* par des entérocytes pré-traités par patuline n'a pas été modifiée par un anticorps monoclonal anti E-cadhérine. Cette observation suggère que la E-cadhérine n'intervient pas dans l'endocytose de *C. albicans* par les entérocytes après rupture de jonctions serrées [22].

TABLEAU I. — Les jonctions serrées limitent l’internalisation de *C. albicans* dans les entérocytes à la phase précoce de l’interaction.

a : Rôle de la différenciation cellulaire. La différenciation des cellules Caco-2 est contrôlée en étudiant la résistance électrique trans-épithéliale qui augmente avec la maturation des jonctions serrées, l’expression de l’apolipoprotéine A IV qui est un marqueur de différenciation des entérocytes, et l’expression de la protéine des jonctions serrées ZO-1. A 15 jours de culture, les tapis cellulaires sont constitués d’entérocytes différenciés. Pour ces expériences, les tapis cellulaires à différents temps de culture sont incubés avec *C. albicans* pendant 2 heures puis le pourcentage de levures internalisées est déterminé en immunofluorescence. **b : Altération chimique des jonctions serrées.** La patuline est une mycotoxine qui altère les jonctions serrées. Après avoir montré qu’une exposition à la patuline 100 μM n’exerce pas de toxicité sur des cellules Caco-2 différenciées, l’internalisation de *C. albicans* est évaluée avec et sans pré-traitement de tapis cellulaires par la patuline 100 μM pendant 4h. Le pourcentage de levures internalisées est déterminé en immunofluorescence. **c. Exposition à un inhibiteur de l’endocytose.** Les tapis cellulaires différenciés, pré-traités par la patuline 100 μM pendant 4h, sont ensuite exposés pendant 2 heures à la cytochalasine D 0.5 μM , un inhibiteur de l’endocytose. Le pourcentage de levures internalisées est déterminé en immunofluorescence. *p < 0.05 ; **** p. < 0.0001

| I a | cellules à 15 jours de culture | cellules à 1 jour de culture |
|-------------------------------|-----------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Pourcentage d’internalisation | 11.8 %* | 37.5 % |
| | | |
| I b | patuline 100 μM | témoins |
| Pourcentage d’internalisation | 22 %* | 9.3 % |
| | | |
| I c | cytochalasine D 0.5 μM | témoin patuline |
| Pourcentage d’internalisation | 14.33 %**** | 22 % |

Des altérations des jonctions serrées sont décrites dans les MICI, la maladie coeliaque, la maladie du greffon contre l’hôte, le diabète de type 1 [18, 23], l’entéropathie aux anti-inflammatoires non-stéroïdiens [24], les brûlures sévères [25] et l’obésité [26]. Les cytokines [17] et le lipopolysaccharide de paroi des bactéries gram-négatives [27] provoquent également une altération des jonctions serrées. Au cours des MICI, l’altération des jonctions serrées est considérée comme jouant un rôle dans la pathogenèse de la maladie [19, 23]. L’augmentation de perméabilité de la barrière épithéliale qui en résulte expose en effet la *lamina propria* à des microorganismes et des antigènes de la lumière intestinale, qui provoquent une réponse cytokinique des cellules immunitaires renforçant elle-même l’altération des jonctions serrées. Plusieurs arguments suggèrent également un rôle du mycobiote dans la physiopathologie des MICI [28]. Ainsi, chez des patients atteints de maladie de Crohn on détecte des anticorps anti-*Saccharomyces cerevisiae* dirigés contre l’antigène mannane de paroi de *Candida spp.*, avec une fréquence élevée. D’autre part des variants du gène codant pour CARD9 sont identifiés chez les patients atteints de MICI. Or la voie de signalisation CARD9, qui mène à la production de cytokines pro-inflammatoires, est activée par l’engagement de la dectine-1, un récepteur pour

les glucanes de la paroi fongique. Enfin, des modifications de la composition du mycobiote sont décrites chez les patients atteints de MICI, avec une augmentation de la prévalence du portage de *Candida spp.*, et notamment de *C. albicans* ou *C. tropicalis* [4, 5].

Compte tenu de ces éléments, les résultats que nous présentons, qui indiquent qu'une altération des jonctions serrées facilite l'invasion de *C. albicans* à travers la barrière intestinale, donnent une base cellulaire aux hypothèses impliquant le mycobiote dans la pathogenèse des MICI. En effet, la colonisation majorée par *Candida spp.*, conjuguée à l'altération des jonctions serrées classiquement décrite au cours des MICI, favorise la translocation de *C. albicans* au niveau de la *lamina propria*. D'autant que des travaux récents montrent que *C. albicans* induit lui-même une perturbation des jonctions serrées et une altération de la barrière muqueuse [29]. Cet afflux des éléments fongiques et/ou de leurs antigènes au niveau de la *lamina propria* est susceptible d'activer les cellules de l'immunité innée et acquise qui s'y trouvent, renforçant la réponse cytokinique pro-inflammatoire et donc l'évolution de la maladie. Plus largement, nos résultats indiquent que les situations cliniques s'accompagnant d'une altération des jonctions serrées sont susceptibles de favoriser le passage de *C. albicans* à travers la barrière épithéliale intestinale.

***C. albicans* utilise les cellules M pour envahir la muqueuse intestinale *in vitro*.**

Les cellules M sont des cellules épithéliales spécialisées des muqueuses des voies aériennes et de l'intestin. Elles assurent l'endocytose de molécules, d'antigènes et de microorganismes présents au niveau de la lumière intestinale, et leur transport vers les cellules immunitaires de la *lamina propria* [30, 31]. Au niveau de l'intestin les cellules M sont présentes dans l'épithélium situé en regard des formations lymphoïdes de la *lamina propria* (plaques de Peyer, follicules lymphoïdes). Les cellules M présentent un pôle apical avec des microvillosités irrégulières et en nombre réduit, et une poche basolatérale où s'engagent les macrophages, cellules dendritiques et lymphocytes [31, 32]. Dans les conditions physiologiques de fonctionnement de l'épithélium, les jonctions serrées assurent, on l'a vu, un rôle de barrière vis-à-vis du passage des antigènes et microorganismes luminaux. Les cellules M, spécialisées dans la transcytose, sont donc des « cellules sentinelles » intervenant dans la surveillance et l'initiation de la réponse immunitaire muqueuse. Elles permettent également l'induction d'une tolérance immunitaire qui évite une réponse non-maîtrisée vis-à-vis des antigènes alimentaires et des microorganismes en contact avec la muqueuse intestinale [31, 33], et sont capables d'une réponse différenciée aux bactéries commensales [30].

De nombreux microorganismes pathogènes utilisent les cellules M comme porte d'entrée pour l'invasion tissulaire [32], mais alors que *C. albicans* est présent au niveau de la muqueuse intestinale chez une majorité de sujets, l'interaction de *C. albicans* avec les cellules M n'a pas été étudiée. Pour aborder cette question, nous avons développé le modèle décrit par des Rieux *et al* [34] qui permet la

différentiation d'entérocytes de la lignée Caco-2 en cellules M en présence de lymphocytes B de la lignée Raji. Dans ce modèle, 5 à 10 % des entérocytes en co-cultures avec les cellules Raji présentent les caractères de cellules M. Nous avons d'abord montré que l'adhérence de *C. albicans* à des cultures mixtes entérocytes / cellules M était doublée par rapport à l'adhérence à des monocultures entérocytaires (tableau 2a). La capacité de *C. albicans* à adhérer préférentiellement aux cellules M a été précisée en microscopie à fluorescence en montrant que 73.6 % des formes adhérentes de *C. albicans* étaient au contact de cellules M [35]. Dans un second temps, nous avons montré que l'internalisation de *C. albicans* dans les cellules était multipliée par 3 dans les cultures mixtes par rapport aux monocultures entérocytaires (tableau 2b). L'étude en microscopie à fluorescence de cultures mixtes a ensuite confirmé que l'internalisation dans les cellules M était très supérieure à l'internalisation dans les entérocytes (tableau IIc). Dans une troisième série d'expériences, nous avons montré que la translocation de *C. albicans* au pôle basal des cellules qui était de 1.7 % de l'inoculum en monoculture atteignait 4 % dans les cultures mixtes (tableau IIId). Enfin, l'interaction de *C. albicans* avec des cultures mixtes a été étudiée après pré-traitement par la cytochalasine D, un inhibiteur des microfilaments d'actine qui bloque le processus d'endocytose par les cellules. La cytochalasine n'a pas modifié l'internalisation de *C. albicans* dans les entérocytes (tableau IIe). Ceci est cohérent avec le fait que seule la pénétration active par *C. albicans* est possible dans ces cellules en présence de jonctions serrées fonctionnelles [16, 22]. En revanche, le pré-traitement par la cytochalasine D a réduit l'internalisation dans les cellules M (tableau IIe), indiquant que les cellules M sont capables d'internaliser *C. albicans* par endocytose.

En démontrant une interaction préférentielle de *C. albicans* avec les cellules M au niveau de l'épithélium intestinal, et la capacité de *C. albicans* à utiliser les cellules M pour traverser la barrière épithéliale, ces résultats appellent des travaux complémentaires afin — d'identifier les adhésines fongiques et les récepteurs des cellules M intervenant dans la reconnaissance mutuelle — de préciser les mécanismes permettant le transport intracellulaire de *C. albicans* au pôle basal des cellules M — de caractériser les voies de signalisation des cellules M engagées au cours de l'interaction avec *C. albicans* — de décrire les mécanismes immunitaires et inflammatoires mis en jeu au niveau de la *lamina propria* par la translocation de *C. albicans* à travers les cellules M — de déterminer la capacité des cellules M à différencier *C. albicans* sous forme commensale et pathogène. Les réponses à ces questions permettront d'affiner la compréhension des mécanismes en jeu à la phase précoce des candidoses invasive à point de départ intestinal, de préciser le rôle du mycobiote dans de nombreuses affections dont les MICI, enfin, de mieux comprendre les bases fondamentales de la transition commensal-pathogène.

TABLEAU II. — *C. albicans* utilise les cellules M pour envahir la muqueuse intestinale *in vitro*.

a : Adhérence. Après inoculation de monocultures entérocytaires et de cultures mixtes entérocytes / cellules M, le pourcentage de levures adhérentes est déterminé en immunofluorescence après 30 minutes. **b : Internalisation.** Des monocultures entérocytaires, et des cultures mixtes entérocytes / cellules M sont incubées avec *C. albicans* pendant 2 heures, puis l'internalisation de *C. albicans* est évaluée en immunofluorescence. **c :** Des cultures mixtes entérocytes / cellules M sont incubées avec *C. albicans* pendant 2 heures, puis l'internalisation de *C. albicans* est évaluée en immunofluorescence en distinguant les entérocytes et les cellules M. **d : Translocation.** Pour ces expériences, des monocultures entérocytaires et des cultures mixtes entérocytes / cellules M sur des inserts permettant un accès au pôle basal des cellules sont inoculées avec *C. albicans*. A 24h de culture, la translocation de *C. albicans* est évaluée en déterminant le nombre de levures dans le milieu de culture au pôle basal des cellules. **e : Internalisation en présence de cytochalasine D.** Des cultures mixtes entérocytes / cellules M sont incubées pendant 2 heures en présence et en absence de cytochalasine D 0.5 µM, puis l'internalisation de *C. albicans* est évaluée en immunofluorescence en distinguant les entérocytes et les cellules M. * p. < 0.05 ** p. < 0.01 *** p. < 0.001 ****p < 0.0001 ns : non significatif

| II a | culture mixte entérocytes / cellules M | monoculture entérocytes |
|----------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------|
| Adhérence à 30 minutes | 6.4 %**** | 3 % |
| | | |
| II b | culture mixte entérocytes / cellules M | monoculture entérocytes |
| Internalisation à 2 heures | 15.7 %**** | 5.3 % |
| | | |
| II c | cellules M | entérocytes |
| Internalisation à 2 heures | 38.7 %*** | 5.2 % |
| | | |
| II d | culture mixte entérocytes / cellules M | monoculture entérocytes |
| Translocation à 24h | 4 %* | 1.7 % |
| | | |
| II e | Pré-traitement par cytochalasine D | témoin |
| Internalisation à 2h entérocytes | 4.1 % ^{ns} | 5.2 % |
| Internalisation à 2h cellules M | 14.8 %** | 38.7 % |

CONCLUSION

Les micromycètes sont des micro-organismes eucaryotes ubiquistes de l'environnement humain. Les méthodes de séquençage à haut débit suggèrent que le nombre d'espèces fongiques existantes est de l'ordre de 1,5 à 5 millions [36, 37]. Parmi elles, 300 sont régulièrement impliquées en médecine humaine, et sont responsables d'infections superficielles et profondes. Environ 1 milliard d'individus présentent une infection fongique, et on estime à 1,5 millions le nombre annuel de décès au cours de ces infections [38]. Les micromycètes font partie du microbiote de la peau et des muqueuses. Le séquençage métagénomique, qui permet une caractérisation

globale du microbiote prenant en compte les organismes non-cultivables ou à croissance lente, indique que le mycobiote intestinal est une fraction très minoritaire du microbiote global. Le mycobiote jouerait néanmoins un rôle important dans l'homéostasie digestive et dans la physiopathologie de certaines maladies.

Plusieurs études montrent des perturbations du mycobiote intestinal, avec augmentation du portage de *Candida spp.* et notamment de *C. albicans*, au cours d'affections intestinales [4,5,6,7,8, 28], hépatiques [9], pulmonaires [11], ou systémiques [10]. Beaucoup de ces études sont des études cliniques, qui établissent des corrélations, mais ne permettent pas de préciser si la dysbiose est cause ou conséquence des déséquilibres de la muqueuse intestinale. Toutefois, des travaux expérimentaux chez l'animal, avec administration digestive d'antifongiques, d'inoculum fongiques contrôlés ou d'extraits fécaux confortent l'hypothèse d'un rôle causal des perturbations du mycobiote dans des modèles de colite inflammatoire chez la souris [28], de syndrome du colon irritable chez le rat [7] ou de cirrhose hépatique alcoolique chez la souris [9]. Un envahissement tissulaire intestinal [28], ou une altération de la perméabilité de la muqueuse intestinale favorisant le passage d'antigènes fongiques [7, 9] sont évoqués pour expliquer le rôle du mycobiote dans ces modèles. Des interactions du mycobiote avec la fraction bactérienne du microbiote sont également décrites, notamment au cours des MICI [4, 5], soulignant la complexité du dialogue moléculaire qui s'établit au sein du microbiote, et ouvrant de nouvelles voies de recherche physiopathologique et clinique.

La barrière épithéliale représente dans tous les cas la première ligne de défense vis-à-vis de *C. albicans*. Après avoir montré que *C. albicans* envahit les entérocytes exclusivement par pénétration active des formes filamenteuses [16], nous décrivons ici deux nouveaux mécanismes de pénétration de *C. albicans* à travers la barrière épithéliale : — la voie basolatérale par endocytose de *C. albicans* par les entérocytes en cas d'altération des jonctions serrées [22] — l'endocytose par les cellules M [35]. Ces résultats fournissent une base cellulaire aux études impliquant le mycobiote dans la physiopathologie d'affections digestives ou extra-digestives, via la translocation d'éléments mycéliens ou d'antigènes fongiques qui permettent une interaction des éléments du mycobiote avec le système immunitaire de l'hôte. Ils devront être complétés d'études dans des modèles expérimentaux, ainsi que d'études cliniques, afin de préciser si les observations *in vitro* et chez l'animal s'appliquent à l'histoire naturelle des affections impliquant le mycobiote chez l'homme.

RÉFÉRENCES

- [1] Qin J, Li R, Raes J et al. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010;464:59-65.
- [2] Huseyin CE, O'Toole PW, Cotter PD, Scanlan PD. Forgotten fungi- the gut mycobiome in human health and disease. *FEMS Microbiol Rev*. 2017;41:479-511.
- [3] Nash AK, Auchtung TA, Wong MC et al. The mycobiome of the human microbiome project healthy cohort. *Microbiome*. 2017;5:153-65.

- [4] Hoarau G, Mukherjee PK, Gower-Rousseau C *et al.* Bacteriome and mycobiome interactions underscore microbial dysbiosis in familial Crohn's disease. *mBio*. 2016;7:e01250-16.
- [5] Sokol H, Leducq V, Aschard H *et al.* Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut*. 2017 ; 66:1039-48.
- [6] Frykman PK, Nordenskjöld A, Kawaguchi A *et al.* Characterization of bacterial and fungal microbiome in children with Hirschsprung disease with and without a history of enterocolitis: a multicenter study. *PLoS ONE*. 2015;10:e0124172.
- [7] Botschuijver S, Roeselers G, Levin E *et al.* Intestinal fungal dysbiosis is associated with visceral hypersensitivity in patients with irritable bowel syndrome and rats. *Gastroenterology*. 2017 ; 153:1026-39.
- [8] Luan C, Xie L, Yang X *et al.* Dysbiosis of fungal microbiota in the intestinal mucosa of patients with colorectal adenomas. *Sci Rep*. 2015;5:7980.
- [9] Yang AM, Inamine T, Hochrath K *et al.* Intestinal fungi contribute to development of alcoholic liver disease. *J Clin Invest*. 2017;127:2829-2841.
- [10] Van der Velden WJFM, Netea MG, de Haan AFJ, Huls GA, Donnelly JP, Blijlevens NMA. Role of the mycobiome in human acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2013;19:329-332.
- [11] Fujimura KE, Sitarik AR, Havstad S *et al.* Neonatal gut microbiota associates with childhood multi-sensitized atopy and T-cell differentiation. *Nat Med*. 2016;22:1187-1191.
- [12] Chen Y, Chen Z, Guo R *et al.* Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011;70:492-498.
- [13] Bonnin A. Transition commensal-pathogène au cours des candidoses invasives à *Candida albicans* : approches moléculaires et cellulaires. *Bull Acad Natle Méd*. 2012;196:139-149.
- [14] Iliev ID, Underhill DM. Striking a balance : fungal commensalism versus pathogenesis. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16:366-373.
- [15] Naglik JR, König A, Hube B, Gaffen SL. *Candida albicans*-epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. *Curr Opin Microbiol*. 2017;40:104-112.
- [16] Dalle F, Wächter B, L'Ollivier C *et al.* Cellular interactions of *Candida albicans* with human oral epithelial cells and enterocytes. *Cell Microbiol*. 2010;12:248-271.
- [17] Garcia-Hernandez V, Quiros M, Nusrat A. Intestinal epithelial claudins : expression and regulation in homeostasis and inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2017;1397:66-79.
- [18] Odenwald MA, Turner JR. The intestinal epithelial barrier: a therapeutic target ? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14:9-21.
- [19] Capaldo CT, Powell DN, Kalman D. Layered defense: how mucus and tight junctions seal the intestinal barrier. *J Mol Med*. 2017;95:927-934.
- [20] Guttman JA, Finlay BB. Tight junctions as targets of infectious agents. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788:832-841.
- [21] Phan QT, Myers CL, Fu Y *et al.* Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells. *PLoS Biol*. 2007;5:543-557.
- [22] Goyer M, Loiselet A, Bon F *et al.* Intestinal cell tight junctions limit invasion of *Candida albicans* through active penetration and endocytosis in the early stages of the interaction of the fungus with the intestinal barrier. *PLoS ONE*. 2016;11:e0149159.
- [23] Stremmel W, Staffer S, Schneider MJ *et al.* Genetic mouse models with intestinal-specific tight junction deletion resemble an ulcerative colitis phenotype. *J Crohns Colitis*. 2017;11:1247-1257.
- [24] Utzeri E, Usai P. Role of non-steroidal anti-inflammatory drugs on intestinal permeability and nonalcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol*. 2017;23:3954-3963.

- [25] Costantini TW, Peterson CY, Kroll L et al. Role of p38 MAPK in burn-induced intestinal barrier breakdown. J Surg Res. 2009;156:64-69.
- [26] Lim SM, Jeong JJ, Woo KH, Han MJ, Kim DH. Lactobacillus sakei OK67 ameliorates high-fat diet-induced blood glucose intolerance and obesity in mice by inhibiting gut microbiota lipopolysaccharide production and inducing colon tight junction protein expression. Nutr Res. 2016;36:337-348.
- [27] Lei S, Cheng T, Guo Y, Li C, Zhang W, Zhi F. Somatostatin ameliorates lipopolysaccharide-induced tight junction damage via the ERK-MAPK pathway in Caco-2 cells. Eur J Cell Biol. 2014;93:299-307.
- [28] Iliev ID, Funari VA, Taylor KD et al. Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. Science. 2012;336:1314-1317.
- [29] Böhringer M, Pohlers S, Schulze S et al. Candida albicans infection leads to barrier breakdown and a MAPK/NF- κ B mediated stress response in the intestinal epithelial cell line C2BBel1. Cell Microbiol. 2016;18:889-904.
- [30] Laphthorne S, MacSharry J, Scully P, Nally K, Shanahan F. Differential intestinal M-cell gene expression response to gut commensals. Immunology. 2012;136:312-324.
- [31] Lo DD. Vigilance or subversion ? Constitutive and inducible M cells in mucosal tissues. Trends Immunol. 2018;39:185-195.
- [32] Clark MA, Jepson MA. Intestinal M cells and their role in bacterial infection. Int J Med Microbiol. 2003;293:17-39.
- [33] Rynda A, Maddaloni M, Mierzejewska D et al. Low-dose tolerance is mediated by the M cell ligand, reovirus protein sigma one. J Immunol. 2008;180:5187-5200.
- [34] des Rieux A, Fievez V, Theate I, Mast J, Preat V, Schneider YJ. An improved *in vitro* model of human intestinal follicle-associated epithelium to study nanoparticle transport by M cells. Eur J Pharm Sci. 2007. 30:380-391.
- [35] Albac S, Schmitz A, Lopez-Alayon C et al. Candida albicans is able to use M cells as a portal of entry across the intestinal barrier *in vitro*. Cell Microbiol. 2016;18:195-210.
- [36] Blackwell M. The fungi : 1,2,3...5.1 million species ? Am J Bot. 2011;98:426-438.
- [37] Heitman J. Microbial pathogens in the fungal kingdom. Fungal Biol Rev. 2011;25:48-60
- [38] Cornely OA, Lass-Flörl C, Lagrou K, Arsic-Arsenijevic V, Hoenigl M. Improving outcome of fungal diseases- Guiding experts and patients towards excellence. Mycoses. 2017;60:420-425.

DISCUSSION

M^{me} Monique ADOLPHE

Pourquoi avez-vous choisi Candida albicans plutôt qu'un autre agent infectieux sur vos cultures intestinales ?

Notre problématique scientifique de départ concerne la physiopathologie des candidoses invasives. La mortalité de ces formes invasives est en effet de l'ordre de 50 %, et leur fréquence est en augmentation. L'espèce *Candida albicans* est en cause dans la moitié des cas. *C. albicans* est un agent commensal de la muqueuse intestinale. Chez les sujets sains il se développe en équilibre avec la composante bactérienne du microbiote, avec la barrière épithéliale et avec la réponse immunitaire muqueuse. La rupture de cet équilibre chez des patients fragilisés occasionne les formes invasives, dont la porte d'entrée est le

plus souvent intestinale. L'interaction de *C. albicans* avec la barrière épithéliale intestinale est l'étape initiale au cours de ces candidoses invasives à porte d'entrée digestive. C'est dans ce cadre que nous avons été amenés à décrire les mécanismes de la translocation de *C. albicans* à travers l'épithélium intestinal,

De façon intéressante, les mécanismes cellulaires que nous avons décrits peuvent prendre une signification nouvelle dans le contexte de travaux récents qui attribuent au mycobiote intestinal, et souvent à *C. albicans*, un rôle possible dans la pathogenèse de maladies diverses comme les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'objectif de cette communication est donc de replacer les mécanismes cellulaires de translocation de *C. albicans* à travers l'épithélium intestinal dans ce contexte nouveau, et d'en discuter la signification physiopathologique.

M. Vincent DELMAS

Les différentes parties de l'intestin sont-elles concernées de façon identique et parallèle ?

La charge microbienne globale n'est pas homogène au long du tractus intestinal. De l'ordre de 10^4 à 10^3 par gramme au niveau du duodénum, elle atteint 10^4 à 10^7 par gramme au niveau de jéjunum et de l'iléon, et 10^{11} à 10^{12} par gramme au niveau du colon (Schippa S et Conte MP, Nutrients 2014 ; 6 : 5786-5805). La plupart des études du microbiote intestinal portent sur les fèces, sans permettre de distinguer l'intestin grêle du colon. Par ailleurs nous n'avons jamais réalisé d'études histologiques chez l'animal ou chez l'homme pour comparer l'interaction de *C. albicans* avec la muqueuse colique ou la muqueuse de l'intestin grêle.

Au plan cellulaire, le modèle que nous utilisons, Caco-2, dérive d'une tumeur colorectale. Nous avons montré antérieurement que l'interaction de *C. albicans* avec Caco-2 diffère de l'interaction avec des cellules épithéliales orales (Dalle F *et al*, Cellular Microbiology 2010 ; 12 : 248-271). En revanche nous n'avons pas comparé Caco-2 avec un modèle cellulaire dérivé de l'intestin grêle. Pour autant, les cellules Caco-2 présentent des marqueurs de différenciation entérocytaire, et en tant que modèle cellulaire, la lignée Caco-2 permet des observations qui sont probablement extrapolables à l'ensemble des entérocytes, quelle que soit leur localisation le long du tractus intestinal.

Des différences entre intestin grêle et colon peuvent en revanche être liées au microenvironnement des entérocytes. Il en est ainsi de la composition et de l'abondance du mucus, qui diffèrent entre l'intestin grêle et le colon, modifiant l'accès des micro-organismes aux cellules, de la présence restreinte au grêle des cellules de Paneth qui produisent des molécules anti-microbiennes (Okumura R et Takeda K, Experimental and Molecular Medicine 2017 ; 49 : e338), et de la composante bactérienne du microbiote, plus importante au niveau du colon. Ces éléments du microenvironnement intestinal, qui sont susceptibles de moduler l'interaction de *C. albicans* avec les cellules épithéliales *in-vivo*, ne sont pas appréhendés dans un modèle *in vitro* et dans les travaux que nous avons présentés. D'autres modèles cellulaires, des modèles de co-cultures et des modèles animaux seront donc nécessaires pour répondre à cette question.