

Université de Montréal

**Analyse des altérations de l'immunité T-dépendante à
l'égard de *Candida albicans* chez la souris transgénique
exprimant le génome du VIH-1**

par

Mathieu Goupil

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de PhD
en microbiologie et immunologie

Novembre 2013

© Mathieu Goupil, 2013

Résumé

La candidose oro-pharyngée (COP) est l'infection fongique opportuniste la plus commune chez les individus infectés par le VIH-1. La production des cytokines Il-17 et Il-22 par les lymphocytes Th17 est importante lors de la résolution de la COP, puisque ces cytokines induisent la production de peptides antifongiques et le recrutement des neutrophiles polymorphonucléaires. Toutefois, les lymphocytes Th17 sont préférentiellement déplétés chez les individus infectés par le VIH-1. Le modèle de COP chez la souris transgénique (Tg) CD4C/HIV^{MutA}, exprimant les gènes nef, env et rev du VIH-1, permettra de déterminer si des altérations quantitatives et/ou fonctionnelles des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ causent la sensibilité à la candidose. Les sous-populations Th1, Th2, Th1Th17, Th17 et Treg, ainsi que leurs précurseurs, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs, sont sévèrement déplétées dans les ganglions cervicaux de la souris Tg. Cependant, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs conservent la capacité à se différencier *in vitro* en présence de cytokines polarisantes et à produire les cytokines typiques des diverses sous-populations. De plus, les cytokines requises pour la polarisation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs n'étaient pas réduites dans les ganglions cervicaux des souris Tg, 7 jours après le début de l'infection. Les gènes *S100a8*, *Ccl20*, *Il17* et *Il22* étaient surexprimés en réponse à la COP chez la souris non-Tg, mais pas chez la souris Tg. Le traitement de souris Tg infectées à l'aide de la combinaison des cytokines Il-17 et Il-22 réduit significativement la charge fongique buccale de *C. albicans* et le nombre d'hyphes dans l'épithélium de la langue et restaure la capacité à surexprimer des gènes *S100a8*, *Ccl20* et *Il22*. Ces résultats démontrent que la perturbation de l'induction de l'immunité innée par l'Il-17 et l'Il-22 augmente la susceptibilité à la COP chez la souris Tg.

Mots-clés: Candidose oro-pharyngée, cytokine, Il-17, Il-22, modèle animal, Th17, lymphocyte T régulateur, VIH-1.

Abstract

Oropharyngeal candidiasis (OPC) is the most common opportunistic fungal infection in HIV-infected individuals. OPC resolution involves Il-17 and Il-22 production by Th17 cells through oral antifungal peptide production and polymorphonuclear neutrophil recruitment. Conversely, Th17 cells are preferentially depleted in HIV-infected individuals. The OPC model in transgenic (Tg) mice expressing *nef*, *env* and *rev* from the HIV-1 genome enables the study of the quantitative and functional defects of the CD4⁺ T-cell subpopulations. The Th1, Th2, Th1Th17, Th17 and Treg subpopulations, as well as naïve CD4⁺ T-cell precursors, are severely depleted in the cervical lymph nodes (CLNs) of Tg mice. However, the differentiation capacity of naïve CD4⁺ T-cells in response to polarizing cytokines was maintained *in vitro* in Tg mice, as well as their ability to produce the signature cytokines of the various subpopulations. Moreover, the polarizing cytokines were not reduced in the CLNs of Tg mice, 7 days after infection. The *S100a8*, *Ccl20*, *Il17* and *Il22* genes were up-regulated in response to OPC in non-Tg mice, but not in Tg mice. Treatment of infected Tg mice with a combination of Il-17 and Il-22 cytokines significantly reduced the oral fungal burdens of *C. albicans* as well as the number of hyphae in the tongue epithelium. Treatment also restored *S100a8*, *Ccl20* and *Il22* up-regulation in Tg mice. These results show that defective induction of innate immunity, normally mediated by Il-17 and Il-22, increases the susceptibility to OPC in these Tg mice.

Keywords: Animal model, cytokine, HIV-1, Il-17, Il-22, oropharyngeal candidiasis, regulatory T-cell, Th17.

Table des matières

Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles et abréviations	ix
Remerciements	xii
Chapitre 1 - <i>Candida albicans</i> et la candidose	1
<i>Candida albicans</i>	1
Épidémiologie.....	5
Manifestations cliniques	6
Traitement.....	10
Pathogénèse.....	11
Chapitre 2 - Immunité contre <i>Candida albicans</i>	17
Les protéines salivaires.....	17
La muqueuse buccale.....	22
Kératinocytes	22
Neutrophiles polymorphonucléaires (PMNs)	23
Cellules NK (<i>Natural Killer</i>)	24
Cellules de Langerhans.....	25
Macrophages.....	26
Lymphocytes B.....	28
Lymphocytes T	28

Chapitre 3 – Le virus de l’immunodéficience humaine	35
Épidémiologie du VIH	35
VIH-1	36
Infection au VIH-	38
Traitement	43
Chapitre 4 – Modèles d’études de la candidose oro-pharyngée.....	45
Hypothèse.....	51
Chapitre 5 – Matériel et méthodes	53
Souris transgénique CD4C/HIV ^{MutA}	53
Modèle de candidose oro-pharyngée chez la souris transgénique CD4C/HIV ^{MutA}	53
Analyse des sous-populations de lymphocytes T CD4 ⁺ par la cytométrie en flux	54
Tri cellulaire de lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs	56
Différenciation cellulaire de lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs <i>in vitro</i>	57
Production de cytokines <i>in vivo</i> dans les ganglions cervicaux	58
Injection d’Il-17 et/ou d’Il-22	59
Analyses statistiques	60
Chapitre 6 – Résultats	61
Les sous-populations de lymphocytes T CD4 ⁺ sont déplétées chez la souris transgénique CD4C/HIV ^{MutA}	61
L’expression des gènes polarisant la différenciation des lymphocytes T CD4 ⁺ est altérée chez la souris transgénique CD4C/HIV ^{MutA}	63
L’expression du transgène VIH-1 n’altère pas la production de cytokines chez les lymphocytes T CD4 ⁺ différenciés <i>in vitro</i>	65
Altération de la production de cytokines dans les ganglions cervicaux chez la souris transgénique CD4C/HIV ^{MutA}	66
Augmentation de la résistance à la candidose oro-pharyngée suite au traitement de souris transgéniques CD4C/HIV ^{MutA} infectées au <i>C. albicans</i> avec les cytokines Il-17 et Il-22	68

Chapitre 7 – Discussion	75
Fréquence et nombres absolus des lymphocytes T CD4 ⁺	75
Expression <i>in vitro</i> des gènes associés aux sous-populations de lymphocytes T CD4 ⁺	78
Production de cytokines chez les lymphocytes T CD4 ⁺ différenciés <i>in vitro</i>	80
Production de TNF- α et TGF- β dans les ganglions cervicaux <i>in vivo</i>	81
Charge fongique buccale de <i>C. albicans</i> et traitement à l'aide d'Il-17 et Il-22	83
Histopathologie de la langue	84
Expression des gènes <i>Defb3</i> , <i>Ccl20</i> , <i>S100a8</i> , <i>Il17</i> et <i>Il22</i> dans la langue	86
Conclusion	89
Bibliographie	91
Annexe 1 – Milieux et solutions	xiii
Annexe 2 – Articles publiés	xiv

Liste des tableaux

Tableau I – Les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺	29
Tableau II – Combinaisons d’anticorps utilisés pour l’analyse des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺	55
Tableau III – Anticorps utilisés pour l’analyse des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺	55
Tableau IV – Combinaisons d’anticorps utilisés pour le tri des lymphocytes T CD4⁺ naïfs	56
Tableau V – Anticorps utilisés pour le tri des lymphocytes T CD4⁺ naïfs.....	56
Tableau VI – Cytokines et anticorps utilisés pour la différenciation des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺	57
Tableau VII – Trousses de CBA utilisées pour l’analyse de la production de cytokines par les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺	58

Liste des figures

Figure 1. Types morphologiques observés <i>in vivo</i>	3
Figure 2. Candidose pseudomembraneuse	6
Figure 3. Candidose érythémateuse	7
Figure 4. Candidose hyperplasique	8
Figure 5. Perlèche.....	9
Figure 6. La plasticité des lymphocytes T CD4 ⁺ en fonction des cytokines présentes dans le milieu	31
Figure 7. Structure du VIH-1	37
Figure 8. Le génome du VIH-1	37
Figure 9. Progression de l'infection au VIH-1 vers la phase SIDA	40
Figure 10. Construction du transgène CD4C/HIV	49
Figure 11. Sous-populations de lymphocytes T CD4 ⁺ dans les ganglions cervicaux de souris CD4C/HIV ^{MutA} et non-Tg, infectées ou non au <i>C. albicans</i>	61
Figure 12. Nombre de lymphocytes T CD4 ⁺ naïfs extraits de rates de souris CD4C/HIV ^{MutA} et non-Tg lors du tri cellulaire	62

Figure 13. Expression des gènes marqueurs des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺, après différenciation <i>in vitro</i> de lymphocytes T CD4⁺ naïfs provenant de souris CD4C/HIV^{MutA} et non-Tg.....	63
Figure 14. Production de cytokines par les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ différenciées <i>in vitro</i>	65
Figure 15. Production de cytokines dans les ganglions cervicaux de souris CD4C/HIV^{MutA} et non-Tg, 7 jours après infection ou non au <i>C. albicans</i>.....	66
Figure 16. Charge fongique buccale chez les souris CD4C/HIV^{MutA} et non-Tg infectées au <i>C. albicans</i>	68
Figure 17. Coupes histologiques de langues de souris CD4C/HIV^{MutA} et non-Tg, 7 jours après l'infection au <i>C. albicans</i> et traitées ou non avec les cytokines Il-17 et Il-22.....	70
Figure 18. Coupes histologiques de langues de souris témoins CD4C/HIV^{MutA} et non-Tg, non-infectées	71
Figure 19. Analyse au qRT-PCR de l'expression des gènes <i>S100a8</i>, <i>Ccl20</i>, <i>Il22</i>, <i>Il17</i> et <i>Defb3</i> dans les langues de souris CD4C/HIV^{MutA} et non-Tg, 7 jours après l'infection ou non au <i>C. albicans</i>	73

Liste des sigles et des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

AhR : *aryl hydrocarbon receptor*

AIDS: *acquired immunodeficiency syndrome*

Als: *agglutinin-like sequence*

APC: fluorochrome allophycocyane

APOBEC: *apolipoprotein B mRNA editing, enzyme-catalytic, polypeptide-like*

ARN: acide ribonucléique

CCR#: *C-C chemokine receptor*

CD: *cluster of differentiation* (ex. CD4, CD45)

CDEA: Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux

CL: cellule de Langerhans

CLR : *C-type lectin receptor*

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

COP: candidose oro-pharyngée

DC: cellule dendritique

DNMT1 : méthyl transférase de l'ADN I

Egf: *epidermal growth factor*

ERK: *extracellular signal-regulated kinase*

FITC: fluorochrome fluorescein isothiocyanate

Foxp3: *forkhead box P3*

GM-CSF: *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*

Grocott: *Gomori-Grocott methinamine silver stain*

GXM: glucuronoxylomannane

H₂O₂: peroxyde

HAART: *highly active anti-retroviral therapy*

hBD: *human β-defensin*

HIV: *human immunodeficiency virus*

HOSCN: hypothiocyanate

HPS: *hematoxilin phloxine saffron*
Hwp1: *hyphal wall protein-1*
IDO: *indoleamine 2,3-dioxygenase*
IFN: interféron
Il: interleukine
iNOS: *inducible nitric oxide synthase*
IRCM: Institut de recherches cliniques de Montréal
IRF: *interferon regulatory factor*
KcMR: récepteur du mannose des keratinocytes, *keratinocyte mannose receptor*
kDa : kilo Dalton
K.O. : *knockout*
LTR: *long terminal repeat*
MAPK: *mitogen-activated protein kinase*
mBD: *mouse β -defensin*
Mbp: méga paires de bases
MDC: *macrophage-derived chemokine*
MIP: *macrophage inflammatory protein*
MMR: récepteur du mannose des macrophages, *macrophage mannose receptor*
MTL: *mating-type like*
MyD88: *Myeloid differentiation primary response gene 88*
NF- κ B: facteur de transcription nucléaire kappaB, *nuclear factor-kappaB*
NIAID: *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*
NK: *Natural Killer*
NO: oxyde nitrique
Non-Tg: non-transgénique
OPC: *oro-pharyngeal candidiasis*
OSCN⁻: hypocyanate
PAMP: *pathogen-associated molecular patterns*
PE: fluorochrome phycoérythrine
PerCP: fluorochrome peridinin chlorophyll-a protein
PKA: protéine kinase A

PKC: protéine kinase C
PMN: neutrophile polymorphonucléaire
PRR: *pattern recognition receptor*
ROR: *RAR-related orphan receptor*
Saps: *secretory aspartyl proteinase*
SCID: *severe combined immunodeficiency*
SCN⁻: thiocyanate
SIDA: syndrome d'immunodéficience acquise
SIDAM: syndrome d'immunodéficience acquise murin
SIV: *simian immunodeficiency virus*
STAT: *signal transducer and activator of transcription*
TCR: récepteur des cellules T, *T-cell receptor*
Tg: transgénique
Tfh: *T follicular helper*
TGF: *transforming growth factor*
TLR: *toll-like receptor*
TNF: *tumor necrosis factor*
Treg : lymphocyte T régulateur, *regulatory T-cell*
VIH: virus de l'immunodéficience humaine

Remerciements

Merci au Dr. Louis de Repentigny, pour son accueil au sein de son équipe de recherche, sa disponibilité et son intérêt soutenu tout au long de ma maîtrise et de mon doctorat. Les huit années passées sous sa tutelle ont été très fructueuses!

Merci à Mme Francine Aumont, pour son amitié et pour m'avoir appris le bon fonctionnement et la gestion d'un laboratoire de recherche.

Merci à Kassandre Leongson, ma partenaire de laboratoire et ma copine, pour son soutien et ses encouragements.

Merci à Vincent Cousineau-Côté, pour son amitié et pour son aide durant les dernières expériences.

Merci à M. Serge Sénéchal, pour son amitié, ses conseils, ainsi que les nombreuses discussions auxquelles nous avons participé.

Merci au personnel de soutien de l'Université de Montréal, votre aide est toujours précieuse!

Merci à ma famille et mes amis, pour votre enthousiasme face à mes recherches.

Merci à tous.

Chapitre 1 – *Candida albicans* et la candidose

Candida albicans

En 1923, Christine Berkhout crée le genre *Candida* pour neuf espèces de levures préalablement incluses dans le genre *Monilia* (Barnett 2004). Le genre *Candida* contient maintenant plus de 150 espèces possédant les caractéristiques suivantes : reproduction asexuée et cellules bourgeonnantes (Barnett et al. 2000, Barnett 2004). Certaines de ces espèces produisent aussi des hyphes ou des pseudohyphes (Barnett 2004).

Décrite pour la première fois en 1839, *Candida albicans* est une levure diploïde dont le génome est constitué de 8 paires de chromosomes (Noble and Johnson 2007, Rustchenko 2007). La taille du génome haploïde est d'environ 15 Mbp (méga paires de bases) et contient entre 1 et 3,5 Mbp par chromosome (Rustchenko 2007). Le génome de *C. albicans* comprend 6114 cadres de lecture ouverts, dont 774 lui sont spécifiques (Kabir and Hussain 2009). Les gènes représentés par les cadres de lectures contiennent rarement des introns (Calderone 2002). Les altérations sur les chromosomes sont relativement fréquentes (entre 10^{-4} et 10^{-2}), mais cette fréquence augmente davantage suite à l'exposition à des facteurs de stress, tel que la baisse de température ou l'épuisement de nutriments (Rustchenko-Bulgac et al. 1990, Rustchenko 2007).

C. albicans est un organisme polymorphe opportuniste possédant plusieurs phénotypes morphologiques. Plusieurs facteurs influencent le changement de phénotype. Un pH faible (pH<6) favorise le phénotype levure, tandis qu'un pH de 7 favorise le phénotype hyphe (Odds 1988, Mayer et al. 2013). La présence de sérum, de N-acetylglucosamine, de CO₂ et d'un milieu à la température physiologique favorise aussi le phénotype hyphe (Taschdjian et al. 1960, Mardon et al. 1969, Simonetti et al. 1974, Sudbery 2011, Mayer et al. 2013). *C. albicans* produit plusieurs molécules de « quorum sensing », notamment le farnesol, le tyrosol et le dodecanol, lui permettant de déterminer la densité cellulaire du milieu et diriger la morphogénèse vers les formes hyphe (faible densité) ou levure (densité élevée) (Hornby et al. 2001, Chen et al. 2004, Albuquerque and Casadevall 2012, Mayer et al. 2013). Les formes levure, hyphe et pseudohyphe sont retrouvées dans les tissus infectés par *C. albicans in vivo* (Fig.1) (Berman and Sudbery 2002, Mayer et al. 2013). La morphologie de la forme levure se

définie par des cellules ovoïdes nommées blastoconidies se reproduisant par bourgeonnement (Merson-Davies and Odds 1989, Sudbery et al. 2004, Mayer et al. 2013). Les hyphes sont constitués de cellules séparées par des cloisons (*septa*) formant un long tube à paroi parallèles ne présentant pas de constriction (Merson-Davies and Odds 1989, Sudbery et al. 2004, Mayer et al. 2013). Les pseudohyphes sont formés de chaînes de blastoconidies ellipsoïdales présentant des constriction aux *septa* (Merson-Davies and Odds 1989, Sudbery et al. 2004, Mayer et al. 2013). La forme chlamyospore, dont la morphologie représente des cellules aux parois très épaisses souvent retrouvées en position terminale sur les hyphes, est observée *in vitro* lorsque le milieu de culture est pauvre en nutriments (Montazeri and Hedrick 1984, Sonneborn et al. 1999, Whiteway and Bachewich 2007, Mayer et al. 2013). Les phénotypes de colonies opaques et blanches permettent la reproduction parasexuée de *C. albicans* (Hull and Johnson 1999, Noble and Johnson 2007). Les colonies de cellules blanches représentent le phénotype habituellement associé à *C. albicans*, c'est-à-dire des cellules ovoïdes constituant des colonies bombées et brillantes tandis que les colonies de cellules opaques sont formées de cellules allongées donnant naissance à des colonies plates et mattes (Slutsky et al. 1987, Noble and Johnson 2007). Par ailleurs, les conditions physiologiques favorisent la formation d'hyphes chez les cellules blanches, mais pas chez les cellules opaques, qui déclenchent la formation d'hyphes à une température de 25°C (Si et al. 2013).

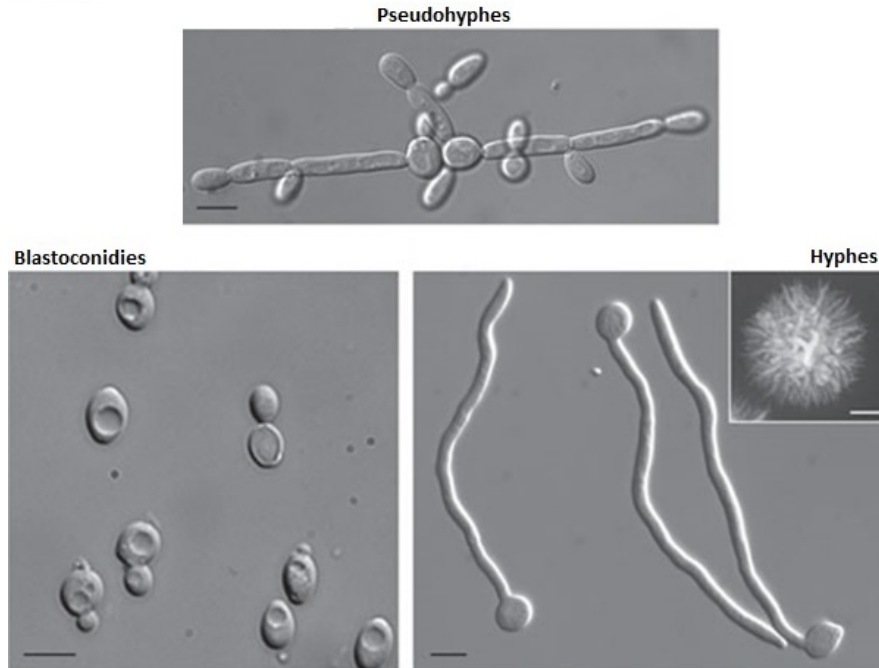


Figure 1. Types morphologiques observés in vivo (Sudbery 2011).

Reproduit avec permission (licence # 3274400215852).

Le cycle de reproduction parasexuée de *C. albicans* est possible grâce aux phénotypes de colonies opaques et blanches contrôlés par le locus MTL (*Mating Type-Like*) qui est situé sur le chromosome 5 (Hull and Johnson 1999, Noble and Johnson 2007). Le locus MTL constitue une région hautement polymorphe qui possède deux allèles, MTL α et MTL α , ayant une forte analogie avec le locus MAT de *Saccharomyces cerevisiae*, un locus aussi impliqué dans la reproduction sexuée (Hull and Johnson 1999, Nantel 2006, Noble and Johnson 2007). Les loci MTL α et MTL α produisent respectivement les sous-unités $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du répresseur $\alpha 1/\alpha 2$ (Whiteway and Bachewich 2007). Le répresseur $\alpha 1/\alpha 2$ inhibe l'expression du facteur de transcription Wor1, l'acteur majeur permettant l'induction du phénotype opaque (Whiteway and Bachewich 2007). Ainsi, il est essentiel pour *C. albicans* d'être homozygote ou hémizygotte au locus MTL afin de promouvoir la transition entre les phénotypes de colonies opaques et blanches (Miller and Johnson 2002, Noble and Johnson 2007, Whiteway and Bachewich 2007). Le mécanisme majeur permettant l'obtention spontanée d'un locus MTL homozygote est la perte d'un des homologues du chromosome 5, suivi de la duplication de l'homologue restant (Wu et al. 2005, Rustchenko 2007). D'autres facteurs de transcription agissent de concert avec Wor1 afin de contrôler le changement phénotypique. Wor2, Wor3 et

Czf1 sont fortement exprimés chez les cellules opaques (Hernday et al. 2013). Wor2 permet le maintien du phénotype opaque durant plusieurs générations, tandis que Czf1 et Wor3 augmentent la fréquence de transition vers le phénotype opaque (Sriram et al. 2009, Hernday et al. 2013). Le facteur de transcription Efg1 est fortement exprimé chez les cellules blanches et inhibe la transition vers le phénotype opaque en se liant à Wor1 (Sriram et al. 2009, Hernday et al. 2013). Ahr1 maintient le phénotype des cellules blanches durant plusieurs générations et favorise la transition des cellules opaques en cellules blanches (Wang et al. 2011, Hernday et al. 2013). Les conditions non-physiologiques favorisent la transition entre les phénotypes de colonies blanches et opaques, et la forme opaque est associée à la reproduction (Rustchenko 2007). En effet, les fréquences de reproduction entre cellules opaques ou entre cellules opaques et blanches sont respectivement entre 10^5 - 10^7 et 10^2 - 10^5 fois plus élevée qu'entre cellules blanches (Miller and Johnson 2002, Rustchenko 2007). Par ailleurs, le passage au phénotype de colonies opaques permet aux levures de détecter la présence de phéromones α et α par l'entremise de la voie de signalisation Cek1 MAP kinase, favorisant ainsi la modification de la morphologie cellulaire par l'apparition de projections d'accouplement (Whiteway and Oberholzer 2004, Whiteway and Bachewich 2007). De plus, la sécrétion de phéromones par les cellules de phénotype opaque stimulerait la création de biofilms par les cellules blanches facilitant ainsi le chimiotropisme et la reproduction (Daniels et al. 2006).

La reproduction sexuée semble maintenant possible chez *C. albicans*, puisque des cellules haploïdes viables, générées par un mécanisme concerté de perte de chromosomes chez des cellules diploïdes, sont observées *in vitro* et *in vivo* (Hickman et al. 2013). Ces cellules sont notablement plus petites, moins virulentes et ont un taux de croissance plus faible. Les cellules haploïdes sont polymorphes, et peuvent éventuellement former le phénotype opaque permettant la reproduction et la restauration de l'état diploïde, ce qui restaure la taille, la virulence et le taux de croissance de la levure (Hickman et al. 2013).

Épidémiologie

C. albicans, un pathogène opportuniste, est retrouvé dans la flore normale de la cavité buccale chez environ 75 % de la population humaine saine (Pfaller and Diekema 2010). De plus, 10 à 20 % des femmes sont porteuses de *Candida* au niveau vaginal (Calderone 2002). Si elle est fréquemment présente en tant que levure commensale chez les animaux à sang chaud, *C. albicans* n'est que très rarement isolée de sources environnementales telles que le sol ou la matière en décomposition (Noble and Johnson 2007).

Malgré sa présence généralement commensale, le genre *Candida* cause 75 % des infections fongiques invasives et est la quatrième source d'infections nosocomiales systémiques résultant en un taux de mortalité pouvant atteindre 50 % (Pfaller and Diekema 2010, Mayer et al. 2013). Par ailleurs, l'incidence d'hospitalisations ayant pour cause l'infection à *Candida* a augmenté de 52 % entre les années 2000 à 2005 (Zilberberg et al. 2008). Les principales espèces impliquées sont *C. albicans*, qui est responsable d'environ 40-70 % des candidoses systémiques et d'environ 90% des candidoses mucoales, ainsi que *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* et *Candida krusei* (de Repentigny et al. 2004, Pfaller et al. 2007, Pfaller and Diekema 2010). La source principale de *Candida* est le tractus gastro-intestinal de l'individu lui-même et l'infection est donc plus souvent endogène. Toutefois, il existe quelques sources exogènes documentées, telles que les solutés contaminés, les cathéters endovasculaires ainsi que la transmission par les professionnels de la santé (Calderone 2002, Pappas 2006, Pfaller and Diekema 2010). Les individus sains ne sont atteints que très rarement de candidose systémique (Calderone 2002). Les individus à risque ont généralement subi une chirurgie, sont atteints d'une neutropénie, ou souffrent de cancer ou de diabète (Calderone 2002, Pfaller and Diekema 2010). L'infection au VIH (virus de l'immunodéficience humaine) prédispose à la candidose mucoale mais très rarement à la candidose systémique (Calderone 2002, Perlroth et al. 2007). Plus de 75% des patients atteints du VIH subiront au moins un épisode de candidose mucoale, et 75% des femmes présentent au moins un épisode de candidose vulvovaginale au cours de leur vie (Calderone 2002, de Repentigny et al. 2004, Pappas et al. 2009). Entre 40-45 % de ces femmes présentent au moins une récurrence de candidose vulvovaginale (Pappas et al. 2009). Toutefois, l'infection au VIH ne

prédispose qu'à la candidose oro-pharyngée et œsophagienne, et non pas à la candidose vulvovaginale (Schuman et al. 1998, de Repentigny et al. 2004).

Manifestations cliniques

C. albicans est responsable d'environ 90 % des infections des muqueuses buccales et génitales (Pfaller et al. 2007). Il existe quatre formes de candidose mucosale orale: la candidose pseudomembraneuse, la candidose érythémateuse, la candidose hyperplasique et la perlèche (Samaranayake et al. 2009). Parmi celles-ci, la candidose pseudomembraneuse est la plus fréquente (Calderone 2002). Les individus immunodéprimés, notamment lors de l'infection au VIH, la chimiothérapie, le cancer ou la prise d'immunosuppresseurs sont prédisposés à la candidose (Calderone 2002, Netea et al. 2008, Samaranayake et al. 2009). Le port d'un appareil orthodontique, la prise d'antibiotiques, la prise de corticostéroïdes oraux et la cigarette sont aussi des facteurs prédisposants (Calderone 2002, Samaranayake et al. 2009). La candidose se manifeste par les symptômes suivants : altération du goût des aliments accompagnée d'une sensation de brûlure, xérostomie et dysphagie (Calderone 2002, de Repentigny et al. 2004, Samaranayake et al. 2009).



Figure 2. Candidose pseudomembraneuse (Samaranayake et al. 2009).

Reproduit avec permission (licence #3274410089805)

La candidose pseudomembraneuse (Fig.2), communément appelée « muguet » est définie comme une infection aiguë présentant des lésions confluentes formant des plaques blanchâtres ou jaunâtres sur les muqueuses labiales et buccales ainsi qu'à la surface de la langue (Samaranayake 1991, Calderone 2002, Lopez-De-Blanc et al. 2002, Samaranayake et al. 2009). Les plaques sont composées d'hyphes, de blastoconidies, de bactéries, de cellules épithéliales desquamées, de cellules inflammatoires et de fibrine (de Repentigny et al. 2004, Samaranayake et al. 2009). Facilement mobilisables à l'aide d'un abaisse-langue, les plaques reposent sur une surface érythémateuse parfois accompagnée de saignement (Samaranayake et al. 2009). Il est important de noter que, puisque les hyphes de *C. albicans* pénètrent rarement au-delà de la couche kératinisée de l'épithélium buccal, le saignement peut être associé à une pathologie sous-jacente tel que le lichen plan érosif ou le pemphigus plutôt qu'à la candidose (Samaranayake et al. 2009).



Figure 3. Candidose érythémateuse (Samaranayake et al. 2009).

Reproduit avec permission (licence #3274410089805)

La candidose érythémateuse (Fig.3) se présente sous la forme d'une lésion rougeâtre positionnée sur la face dorsale de la langue, le palais ou la muqueuse buccale (Lopez-De-Blanc et al. 2002, de Repentigny et al. 2004, Samaranayake et al. 2009). Les lésions de la face dorsale linguale sont souvent dupliquées au niveau du palais (Samaranayake et al. 2009). Les

lésions contiennent peu d'hyphes, mais des blastoconidies sont retrouvées à la surface épithéliale (de Repentigny et al. 2004). Par ailleurs, la candidose érythémateuse est la forme la plus fréquente chez les patients atteints du VIH (Samaranayake and Holmstrup 1989).

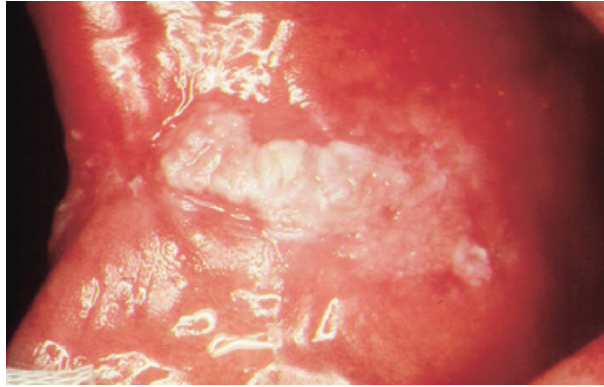


Figure 4. Candidose hyperplasique (Samaranayake et al. 2009)

Reproduit avec permission (licence #3274410089805)

La candidose hyperplasique (Fig.4) se caractérise par des hyphes sur un épithélium hyperplasique infiltré par des cellules inflammatoires, formant des lésions à la surface des joues, la commissure des lèvres et plus rarement, sur les côtés de la langue (Samaranayake et al. 2009). Les lésions forment des plaques soit petites, translucides à blanchâtres ou bien larges, dures et blanches qui ne peuvent pas se retirer facilement par frottement (Samaranayake et al. 2009). La candidose hyperplasique est associée à la transformation maligne dans 15 % des cas (Samaranayake and MacFarlane 1990, Samaranayake et al. 2009).

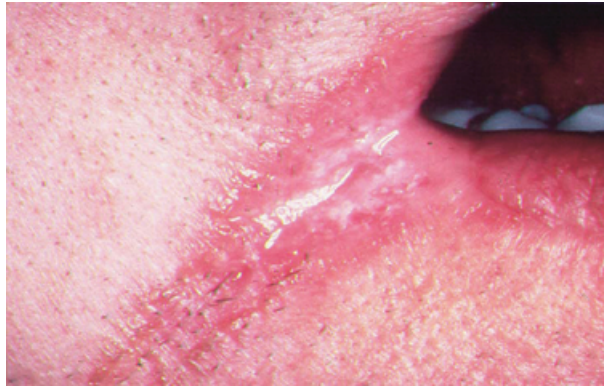


Figure 5. Perlèche (Samaranayake et al. 2009)

Reproduit avec permission (licence #3274410089805)

La chéilite angulaire, ou perlèche, se présente sous forme d'érythème et de fissures formant des lésions à l'apparence humide à la commissure des lèvres, et peut être douloureuse (Samaranayake et al. 2009). En plus de *Candida*, *Staphylococcus aureus* est souvent impliqué en tant qu'agent de co-infection (Warnakulasuriya et al. 1991, Dias and Samaranayake 1995).

C. albicans provoque un autre type de candidose chez la femme : la candidose vulvovaginale, qui est caractérisée par de la douleur accompagnée d'épaisses pertes vaginales blanches et inodores ainsi que de l'inflammation et de l'œdème au niveau vaginal (Hainer and Gibson 2011). L'observation microscopique des sécrétions vaginales révèle la présence de blastoconidies bourgeonnantes (Hainer and Gibson 2011). La quantité de glycogène disponible, le pH de la muqueuse vaginale, la grossesse, le niveau hormonal, les interventions chirurgicales et la prise d'antibiotiques à large spectre sont des facteurs favorisant l'apparition d'une candidose vulvovaginale (Galask 1988, Calderone 2002).

Traitement

Plusieurs antifongiques sont disponibles pour le traitement de la candidose. Leurs méthodes d'administration sont diverses, tout comme la durée du traitement (Samaranayake et al. 2009). Parmi les azolés, le fluconazole est l'antifongique le plus utilisé contre la candidose oro-pharyngée (Melkoumov et al. 2013). Disponible en capsule à prise orale et en formulations intraveineuses, la posologie du fluconazole est de 100 mg par jour pour une durée de 7 à 14 jours (Samaranayake et al. 2009). Très actif contre *C. albicans*, le fluconazole est facilement absorbé au niveau du tractus gastro-intestinal, possède une demi-vie de plus de 27h dans le sang et diffuse bien dans la majorité des sites d'infection, car le fluconazole se lie faiblement aux protéines présentes dans le sérum (Samaranayake et al. 2009). Les effets secondaires du fluconazole, tel que la nausée, les maux de tête et l'inconfort gastro-intestinal, sont généralement légers (Samaranayake et al. 2009). Le fluconazole est administré aux patients séropositifs atteints de candidose oro-pharyngée (de Repentigny et al. 2004, Samaranayake et al. 2009). Cependant, le fluconazole présente de nombreuses interactions médicamenteuses liées à son inhibition du cytochrome p450, notamment avec les antihistaminiques et la cyclosporine (Depont et al. 2007, Samaranayake et al. 2009). De plus, la majorité des souches de *C. krusei* et de *C. glabrata* y sont résistantes (Depont et al. 2007, Samaranayake et al. 2009).

Deux polyènes sont présentement utilisés contre la candidose, l'amphotéricine B en administration intraveineuse et la nystatine en administration topique (Samaranayake et al. 2009). Quoiqu'efficace, l'amphotéricine B cause des effets indésirables sévères, les plus importants étant la néphrotoxicité, l'anémie et l'hypokaliémie (Samaranayake et al. 2009). Les formulations lipidiques de l'amphotéricine B réduisent la néphrotoxicité (Samaranayake et al. 2009). La nystatine est, avec le fluconazole, l'antifongique de choix contre la candidose oro-pharyngée (Samaranayake et al. 2009, Melkoumov et al. 2013). La nystatine est fongistatique ou fongicide, en fonction de sa concentration (Samaranayake et al. 2009). Son application topique s'effectue à l'aide d'une suspension orale, et la nystatine n'est pas absorbée systémiquement et ne présente pas d'interactions médicamenteuses (Melkoumov et al. 2013). La dose normale de nystatine est de 100 000 IU 3 à 4 fois par jour (Samaranayake et al. 2009). Par ailleurs, des travaux récents indiquent que la réduction de la taille de la nystatine en

nanoparticules améliore son efficacité envers *C. albicans in vitro* et *in vivo* (Melkoumov et al. 2013).

Pathogénèse

Les propriétés permettant à une espèce potentiellement pathogène telle que *C. albicans* de causer une infection se nomment les facteurs de virulence.

C. albicans possède une vaste panoplie de facteurs de virulence, dont les plus importants sont le polymorphisme (changement de morphotype), la production d'adhésines et d'invasines, le thigmotropisme, la formation de biofilms et la sécrétion d'enzymes hydrolytiques (protéases et phospholipases) (Calderone and Fonzi 2001, Yang 2003, Mayer et al. 2013). Par ailleurs, certains facteurs de croissance, tel que l'adaptation rapide aux changements de pH, la flexibilité métabolique, la présence de nombreux mécanismes d'acquisition de nutriments et un excellent système de réponse au stress amplifient davantage le potentiel infectieux de *C. albicans* (Calderone 2002, Mayer et al. 2013).

La capacité de *C. albicans* à passer du phénotype levure au phénotype hyphe comporte de nombreux avantages. L'étude d'un mutant dont le polymorphisme est contrôlé par un promoteur soumis à la tétracycline révèle que la forme levure est plus efficace dans la dissémination de *C. albicans*, tandis que la forme hyphe permet une invasion plus en profondeur des tissus (Saville et al. 2003). Les souches mutantes HCG1^{-/-}, un gène codant pour une cycline G1 spécifique à la forme hyphe, sont moins virulentes dans un modèle murin d'infection systémique puisqu'elles ne peuvent pas former d'hyphes (Zheng et al. 2004, Mayer et al. 2013). Le système immunitaire reconnaît les PAMPS (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) de *C. albicans* à l'aide de PRRs (*Pattern Recognition Receptors*). Les TLR (*Toll-Like Receptor*) 2 et 4, ainsi que les CLR (*C-type Lectin Receptors*) dectine-1 et dectine-2 sont impliqués dans la détection de *C. albicans* (Chai et al. 2009, Saijo et al. 2010). TLR2 reconnaît le glucuronoxylomannane (GXM), phospholipomannane et le zymozan, des composantes de la paroi cellulaire (Netea et al. 2008). TLR4 reconnaît les O-mannanes et le GXM (Chai et al. 2009). Dectine-1 et dectine-2 reconnaissent respectivement le β -glucane et les alpha-mannanes (Netea et al. 2008, Chai et al. 2009, Saijo et al. 2010). Le changement du

phénotype levure vers le phénotype hyphe permet de camoufler certaines de ces molécules, notamment le β -glucane, normalement exposé à la surface des blastoconidies au niveau des cicatrices de bourgeonnement (Chai et al. 2009). Par ailleurs, les hyphes de *Candida* n'activent que TLR2 sans activer TLR4, ce qui module la réponse immunitaire vers une réponse de type Th2, qui est non protectrice contre la candidose (Chai et al. 2009). Le passage à la forme hyphe favorise aussi l'expression de gènes associés à d'autres facteurs de virulence, comme les protéines hyphales Hwp1, Eccl et Hyr1, l'agglutinine Als3 (*Agglutinin-like sequence*) et les Saps (protéinases aspartyles sécrétées), notamment Sap4, Sap5 et Sap6 (Mayer et al. 2013).

L'adhérence aux surfaces de l'hôte est essentielle pour *C. albicans*, et celui-ci possède une panoplie de protéines spécialisées de la paroi cellulaire, nommée adhésines, lui permettant de se lier à des substrats biologiques ou synthétiques (Verstrepen and Klis 2006). La synthèse des adhésines est régulée par la cascade de signalisation Ras/cAMP/PKA, la cascade MAP kinase liée à la formation d'hyphes et l'environnement (Hoyer 2001, Verstrepen and Klis 2006). Les adhésines les plus connues sont Als 1 à 7, Als9 et Hwp1 (Hoyer et al. 1995, Hoyer et al. 1998, Hoyer et al. 1998, Hoyer and Hecht 2000, Hoyer 2001, Hoyer and Hecht 2001, Mayer et al. 2013). Als3 et Hwp1 (*Hyphal wall protein 1*) sont particulièrement importantes. Hwp1 agit en tant que substrat pour les transglutaminases des mammifères, ce qui permet la formation de liaisons covalentes entre *C. albicans* et les cellules de l'hôte (Staab et al. 1999, Mayer et al. 2013). Als3 est directement impliquée dans la liaison avec les cellules épithéliales de l'hôte et les souches de *C. albicans* *Als3^{-/-}* présentent une réduction significative de l'adhérence (Hoyer et al. 1998, Murciano et al. 2012). Les protéines Hwp1 et Als3 sont d'ailleurs surexprimées *in vitro* lors de l'infection de cellules épithéliales orales et sont aussi impliquées dans la formation de biofilms en tant qu'adhésines complémentaires (Nobile et al. 2008, Wachtler et al. 2011).

La colonisation du substrat est facilitée par le thigmotropisme de la forme hyphe de *Candida*. En effet, le thigmotropisme permet à la levure de diriger le sens de la croissance des hyphes en fonction de la topographie d'un substrat biologique ou synthétique (Kumamoto and Vines 2005). Des canaux ioniques mécano-sensibles seraient impliqués dans le thigmotropisme, puisque le traitement à l'aide d'un inhibiteur de canaux ioniques réduit la

capacité des hyphes à réorienter leur croissance en fonction des crêtes présentes sur le substrat (Watts et al. 1998).

Il existe deux méthodes par lesquelles *C. albicans* pénètre les cellules de l'hôte, l'induction de l'endocytose et la pénétration active (Naglik et al. 2011, Mayer et al. 2013). L'entrée dans les cellules hôtes telles que les macrophages et les cellules épithéliales implique un mécanisme d'évasion du complément et de camouflage des PAMPs de *C. albicans* (Chai et al. 2009). Deux invasines, Als3 et Ssa1 permettent la liaison avec deux ligands de l'hôte, la E-cadherine, située sur les cellules épithéliales, et la N-cadherine, située sur les cellules endothéliales (Phan et al. 2007). La liaison des invasines avec les ligands de l'hôte induit l'endocytose de *C. albicans* par un mécanisme médié par la clathrine (Moreno-Ruiz et al. 2009). Les souches de *C. albicans* *Als3*^{-/-} ou *Ssa1*^{-/-} sont moins adhérentes et virulentes que les souches témoins parentales dans un modèle murin de candidose oro-pharyngée (Sun et al. 2010, Naglik et al. 2011). Les mécanismes de la pénétration active sont encore méconnus, mais les lipases et phospholipases de *C. albicans* ne semblent pas jouer un rôle (Mayer et al. 2013). Par contre, l'adhésion et les SAPs, par la dégradation de cadhérine, permettant à *C. albicans* de pénétrer entre les cellules, contribuent ainsi à la pénétration active (Mayer et al. 2013).

Les biofilms constituent un important facteur de virulence chez *C. albicans*, car les biofilms matures confèrent une résistance face au système immunitaire et aux antifongiques, notamment le fluconazole, l'amphotéricine B et la nystatine (LaFleur et al. 2006, Fanning and Mitchell 2012). Cette résistance accrue aux antifongiques est causée en partie par la surexpression de pompe d'efflux à l'intérieur du biofilm et par la réduction de la quantité d'ergostérol dans la membrane plasmique (Douglas 2003, Kumamoto and Vences 2005, Fanning and Mitchell 2012). La formation d'un biofilm commence par l'adhérence au substrat (celui-ci peut être biologique ou synthétique) et la prolifération de blastoconidies (Douglas 2003, Fanning and Mitchell 2012). Par la suite, des hyphes se forment à la surface du biofilm, et il y a accumulation des molécules composant la matrice extracellulaire tel que le glucose (Al-Fattani and Douglas 2006). Als1 ou Als3 et Hwp1 sont essentielles pour la formation d'un biofilm (Nobile et al. 2008). Une fois le biofilm formé, la relâche de blastoconidies assure la dispersion de la levure (Fanning and Mitchell 2012).

C. albicans possède trois types d'hydrolases, les protéases, les phospholipases et les lipases. Les hydrolases les plus connues sont les Saps (*Secretory aspartyl proteases*), des protéases permettant l'assimilation de nutriments par la décomposition de molécules complexes et facilitant l'adhérence de *C. albicans* par l'hydrolyse des membranes cellulaires de l'hôte (Naglik et al. 2003, Chai et al. 2009). Un rôle dans la pénétration cellulaire et l'évasion du système immunitaire est aussi suggéré (Naglik et al. 2003). *C. albicans* possède 10 Saps connues, chacune ayant une taille comprise entre 35 et 50 kDa et ayant une activité optimale à un pH variant de 2 à 7 (Naglik et al. 2003). Le lieu d'activité des Saps est variable, puisque Sap1 à Sap8 sont sécrétées dans le milieu, tandis que Sap9 et Sap10 sont ancrées à la paroi cellulaire de *C. albicans* (Monod et al. 1994, Albrecht et al. 2006, Mayer et al. 2013). L'expression des Saps peut être contrôlée au niveau protéique et au niveau de l'ARN messenger, qui est le mode de contrôle principal (Hube et al. 1994, Naglik et al. 2003). Un promoteur différent assure le contrôle de chacun des gènes *Sap1-10*, ce qui permet une régulation individuelle des gènes et la coordination avec d'autres facteurs de virulence, comme la production d'hyphes (Naglik et al. 2004). L'expression des Saps est modulée par le milieu ainsi que le type d'infection, ce qui occasionne des divergences dans l'expression des Saps en fonction du site anatomique de l'hôte. Ainsi, Sap4, Sap5 et Sap6 sont exprimées lors de la colonisation des muqueuses chez des individus atteints de candidose orale et chez les porteurs asymptomatiques, tandis que Sap1-3 sont exprimées uniquement lors de l'infection chez les patients atteints de candidose (Naglik et al. 1999). Dans un modèle murin de candidose oro-pharyngée, Sap7 et Sap8 sont exprimées chez la souris normale ainsi que chez la souris transgénique exprimant le génome du VIH-1 et développant une candidose oro-pharyngée chronique, tandis que Sap5 et Sap9 sont exprimées uniquement chez la souris transgénique (Ripeau et al. 2002). Dans une autre étude comprenant deux modèles murins d'infection œsophagienne ou systémique, Sap5 et Sap6 sont les protéases les plus fortement exprimées lors de l'infection œsophagienne tandis que Sap4, Sap5 et Sap6 sont les protéases principalement exprimées lors de la candidose systémique (Staib et al. 2000). Il est important de noter que, même s'il existe des différences entre chacun des modèles quant aux Saps les plus fortement exprimées, tous les modèles de candidose des muqueuses buccale et vaginale ou les modèles d'épithélium humain reconstitué impliquent au minimum l'expression de Sap4, Sap5 et Sap6 (Naglik et al. 2003). Cela s'explique par les activateurs de transcription Cph1 et

Efg1, qui régulent la formation d'hyphes et la production des Saps4-6 lors de l'infection par *C. albicans* (Ernst 2000, Naglik et al. 2004).

Les phospholipases sont des enzymes permettant l'hydrolyse de phospholipides divisées en quatre groupes distincts (A, B, C et D) en fonction de la liaison ester ciblée par l'enzyme sur les phospholipides (Ansell and Hawthorne 1964, Ghannoum 2000). Parmi les quatre groupes de phospholipases que possède *C. albicans*, seulement cinq membres du groupe B, Plb1 à Plb5, sont présentes dans le milieu extracellulaire et permettent de déstabiliser la membrane plasmique des cellules de l'hôte (Ghannoum 2000). L'infection par une souche *C. albicans Plb1^{-/-}*, dans un modèle murin de candidose systémique, démontre une baisse de la virulence comparativement à l'infection par une souche de *C. albicans* sauvage, tandis que la réinsertion du gène *Plb1* dans le génome de *C. albicans Plb1^{-/-}* restaure la virulence de la souche dans les modèles de candidose systémique intra-gastrique (Leidich et al. 1998, Ghannoum 2000, Mukherjee et al. 2001). De plus, l'inactivation du gène *Plb5* chez *C. albicans* cause une baisse de la virulence dans un modèle murin de candidose systémique (Theiss et al. 2006). La présence de gènes fonctionnels de phospholipase B joue donc un rôle dans la virulence de *C. albicans*.

Le génome de *C. albicans* contient 10 gènes codant pour des lipases, nommées *Lip1* à *Lip10* et possédant une analogie de séquence d'acide aminés pouvant atteindre 80 % (Hube et al. 2000, Schaller et al. 2005). Ces lipases permettent à *C. albicans* de croître lorsque les lipides sont la seule source de carbone (Hube et al. 2000). Les gènes *Lip5*, *Lip6*, *Lip8* et *Lip9* sont exprimés lors de l'infection au *Candida* chez la souris (Hube et al. 2000, Schaller et al. 2005). Si l'infection de souris par une souche *C. albicans Lip8^{-/-}* démontre une baisse significative de la virulence comparativement à l'infection à l'aide d'une souche sauvage dans un modèle murin de candidose systémique, le mécanisme précis des lipases et leurs effets sur la virulence de *C. albicans* lors d'une infection n'est pas encore élucidé (Schaller et al. 2005, Gacser et al. 2007, Mayer et al. 2013).

Tel que mentionné précédemment, certains facteurs de croissance liés à la réponse au stress peuvent s'avérer avantageux pour *C. albicans* et ainsi promouvoir sa virulence. La cascade de signalisation Rim101, avec l'aide des récepteurs de la membrane Dfg16 et Rim21 permettent à *C. albicans* de détecter les changements de pH dans le milieu pour ensuite

exprimer les β -glycosidases nécessaires aux liaisons croisées du β -1,3-glucane, β -1,6-glucane et la chitine de la paroi : Phr1 pour les milieux neutres et alcalins et Phr2 pour les milieux acides (Fonzi 1999, Davis 2009). La catalase Cta1 et les superoxydes dismutases Sod1 et Sod5 permettent à *C. albicans* de contrer les espèces réactives de l'oxygène, tandis que le gène *Yhb1* permet la détoxification des espèces réactives de l'azote (Wysong et al. 1998, Hwang et al. 2002, Martchenko et al. 2004, Hromatka et al. 2005). Plusieurs protéines « *heat-shock* » sont aussi importantes, notamment Hsp90, qui régule la résistance aux antifongiques, la morphogénèse et la formation de biofilms (Shapiro et al. 2009, Robbins et al. 2011, Mayer et al. 2013).

Chapitre 2 – Immunité contre *Candida albicans*

Les protéines salivaires

La calprotectine est une protéine hétérodimérique de 36,5 kDa composée des protéines cationiques calgranuline A (S100a8) et calgranuline B (S100a9) (Abtin et al. 2010, Mehra et al. 2012). La calprotectine séquestre le calcium, le zinc et le manganèse afin d'en réduire la disponibilité dans le milieu (Kleinegger et al. 2001, Mehra et al. 2012, Damo et al. 2013). La calprotectine est sécrétée par les kératinocytes, les granulocytes, les monocytes et les macrophages localisés dans la muqueuse buccale (Eversole et al. 1993, Kleinegger et al. 2001). Les cytokines interleukine (Il)-1 α , Il-6, Il-8, IFN- α et IFN- γ favorisent la production de S100a8 et S100a9 chez les kératinocytes en culture (Abtin et al. 2010). Il existe d'ailleurs une boucle de rétroaction positive entre la production de ces cytokines et l'augmentation de la production de la calprotectine (Nukui et al. 2008). Les cytokines Il-17a, Il-17f et Il-22, seules ou en combinaison, favorisent aussi l'expression de S100a8 et S100a9 chez les kératinocytes (Liang et al. 2006, Wolk et al. 2006). L'effet de la calprotectine sur *C. albicans* est fongistatique ou fongicide, en fonction de sa concentration (Murthy et al. 1993, Kleinegger et al. 2001). Cependant, le surnageant de culture de *C. albicans* ne déclenche pas l'expression de S100a8 et S100a9 par les kératinocytes, alors que la flagelline contenue dans le surnageant de culture de *Escherichia coli* se lie au TLR5 et déclenche la production de ces protéines chez les kératinocytes (Abtin et al. 2010). *In vivo*, la concentration de calprotectine est plus élevée chez les patients atteints de la candidose oro-pharyngée que chez les témoins non-infectés (Eversole et al. 1993, Kleinegger et al. 2001). Par ailleurs, la salive de patients séropositifs contient une concentration plus faible de calprotectine comparativement à la salive de témoins séronégatifs (Challacombe and Sweet 1997).

Les défensines, de petits peptides cationiques de 3-5 kDa exerçant un effet antifongique contre *C. albicans*, sont subdivisées en α -défensines et en β -défensines. Il existe 6 α -défensines chez l'humain (Gallo et al. 2002). Les α -défensines 1-4 sont produites par les granulocytes et emmagasinés dans les granules azurophiles tandis que les α -défensines 5-6 sont produites par les cellules de Paneth du petit intestin et les cellules épithéliales du tractus

vaginal (Gallo et al. 2002). En plus de l'effet antifongique, les α -défensines 1-3 augmentent l'expression de TNF- α et Il-1 chez les monocytes humains activés et réduisent l'expression de VCAM-1 à la surface des cellules endothéliales activées par le TNF- α (Chaly et al. 2000). L'expression des β -défensines humaines varie en fonction du tissu (Semple et al. 2006). Les β -défensines 1-3 sont exprimées principalement au niveau des cellules épithéliales, tandis que la β -défensine 4 est produite par les neutrophiles et les cellules de l'estomac, des poumons, des reins, des testicules et de l'utérus (Harder et al. 1997, Schnapp et al. 1998, Garcia et al. 2001, Garcia et al. 2001, Semple et al. 2006). Chez l'humain, les β -défensines 1-4 sont principalement produites par les kératinocytes (Niyonsaba and Ogawa 2005). Les cytokines Il-17 et Il-22 induisent individuellement ou en synergie l'expression de la β -défensine 2 chez les kératinocytes des voies respiratoires humaines et murines *in vitro* et *ex vivo* (Kao et al. 2004, Liang et al. 2006, Eyerich et al. 2011). À l'instar des β -défensines humaines, l'expression des homologues des β -défensines (m β -défensines) chez la souris varie en fonction du tissu (Schofield et al. 2004). Ainsi, mBD-1 est principalement exprimée dans les poumons et le tractus uro-génital, et mBD-2 est inductible dans les voies respiratoires en présence de LPS (Bals et al. 1998, Morrison et al. 1999, Jia et al. 2000, Burd et al. 2002, Yamaguchi and Ouchi 2012). Les β -défensines mBD-3, mBD-4, mBD-6 et mBD-14 sont généralement exprimées dans l'œsophage, la langue et la trachée, suggérant un rôle dans l'immunité de l'hôte au niveau des muqueuses exposées à l'environnement (Yamaguchi and Ouchi 2012). Chez la souris, les β -défensines mBD-1, mBD-3 et mBD-4 sont exprimées au site d'infection lors de la candidose oro-pharyngée et gastrique (Schofield et al. 2004, Conti et al. 2009). Toutefois, l'expression du gène *Defb3* codant pour mBD-3 est significativement réduite chez les souris Il-17RA K.O., impliquant la signalisation de la cytokine Il-17 lors de la candidose (Conti et al. 2009). De plus, la β -défensine mBD-3 recombinante est fongistatique contre *C. albicans in vitro* (Burd et al. 2002). Les β -défensines humaines sont des molécules chimiotactiques pouvant lier CCR6 et recruter les lymphocytes T mémoires ainsi que les cellules dendritiques immatures (Yang et al. 1999). Les β -défensines murines mBD-2 et mBD-3 exercent leur activité chimiotactique par l'entremise de CCR6 tandis que les β -défensines humaines hBD-2 et hBD-3 et leurs orthologues murins mBD-4 et mBD-14 exercent leur fonction chimiotactique par la liaison aux récepteurs CCR2 et CCR6 (Yang et al. 2002, Rohrl et al. 2010). Par ailleurs, la β -défensine mBD-14 favorise l'activation des macrophages et leur

réponse face aux cytokines pro-inflammatoires par la phosphorylation d'ERK1 et ERK2 ainsi que par l'induction de l'expression des molécules CD86 et F4/80 à la surface cellulaire (Barabas et al. 2013).

Les glandes salivaires parotide et sous-mandibulaire produisent des peptides cationiques riches en histidine possédant des propriétés antifongiques, nommés histatines (Hst) (Edgerton et al. 1998). Les histatines sont produites chez l'homme et chez certains primates, mais pas chez la souris (Kavanagh and Dowd 2004). La production d'histatines est plus élevée chez les patients atteints de candidose oro-pharyngée chronique comparativement aux témoins non-infectés (Bercier et al. 1999). Les Hst 1, Hst 3 et Hst 5 sont les histatines les plus fortement exprimées par les glandes salivaires (Edgerton et al. 1998). *In vitro*, l'histatine la plus fongicide contre *C. albicans* à concentration physiologique est Hst 5 (Edgerton et al. 1998, Kavanagh and Dowd 2004). *Ex vivo*, la cytokine Il-17 induit la production d'histatines par les cellules des glandes salivaires (Conti et al. 2011). L'effet fongicide des histatines origine de mécanismes différents des azolés et des polyènes (Kavanagh and Dowd 2004). Les histatines pénètrent à l'intérieur de *C. albicans* par la liaison à des récepteurs de surface de *C. albicans*, pour ensuite cibler la mitochondrie, bloquer la respiration cellulaire et causer la perte non-lytique d'ATP (Kavanagh and Dowd 2004). De plus, Hst 5 induit la formation d'espèces réactives de l'oxygène à l'intérieur de *C. albicans* et bloque le cycle cellulaire de la levure en phase G1, inhibant ainsi la réplication cellulaire (Helmerhorst et al. 2001, Baev et al. 2002).

Les cathelicidines sont de petits peptides cationiques nommés LL-37 chez l'humain et mCRAMP chez la souris (Mehra et al. 2012). Située au domaine C-terminal, l'activité fongistatique et fongicide est amplifiée par le clivage du peptide par les protéases et est lié à la perturbation sévère de la membrane plasmique de *Candida* (den Hertog et al. 2005, Doss et al. 2010, Mehra et al. 2012). La cathelicidine est produite par les cellules épithéliales de la peau et des muqueuses ainsi que par les mastocytes, les neutrophiles et les macrophages (Doss et al. 2010, McCormick and Weinberg 2010, Mehra et al. 2012). Chez la souris, la production de cathelicidine est augmentée lors de la candidose cutanée, mais les souris déficientes en mCRAMP ne sont pas plus susceptibles à cette candidose (Lopez-Garcia et al. 2005, Mehra et al. 2012). La protéine Msb2, une protéine de détection présente sur la membrane de *C. albicans* et supervisant le maintien de l'intégrité de la paroi et la croissance filamenteuse,

protège la levure des effets de la cathelicidine lorsqu'elle est clivée et sécrétée dans le milieu (Szafranski-Schneider et al. 2012).

La lactoferrine est une glycoprotéine de 77 kDa liant le fer afin d'en réduire la disponibilité pour les pathogènes tels que *C. albicans* (Lupetti et al. 2000). Les cellules épithéliales des muqueuses et les neutrophiles produisent la lactoferrine (Lupetti et al. 2000). Lorsqu'elle n'est pas liée au fer, la lactoferrine est fongicide en fonction de sa concentration et du temps d'exposition (Soukka et al. 1992, Nikawa et al. 1993, Lupetti et al. 2000). En plus de sa fonction inhibitrice de la croissance, la lactoferrine altère la perméabilité de la membrane plasmique de *C. albicans* (Kuipers et al. 1999). Le lavage de la cavité buccale à l'aide d'une solution de lactoferrine réduit l'incidence de candidose oro-pharyngée chez les souris immunosupprimées, tout comme l'ajout de lactoferrine dans l'eau des animaux (Takakura et al. 2003, Takakura et al. 2004). La lactoferrine augmente la production de NO et O⁻ par les macrophages lors de candidose systémique ou lors de l'inoculation péritonéale de cellules mortes de *C. albicans* (Tanida et al. 2001, Wakabayashi et al. 2003). Par ailleurs, la lactoferrine augmente l'efficacité de l'amphotéricine B, de la 5-fluorocytosine et du fluconazole chez les patients immunosupprimés atteints de candidose oro-pharyngée (Kuipers et al. 1999).

L'inhibiteur de protéase leucocytaire, ou antileucoprotéase, est une antiprotéase non-glycosylée de 12 kDa produite par les cellules épithéliales des muqueuses oro-gastriques, respiratoires et génitales (Grutter et al. 1988, Tomee et al. 1997, Chattopadhyay et al. 2004). L'activité antiprotéase de l'antileucoprotéase est localisée au domaine C-terminal de la protéine tandis que l'effet fongicide est proportionnel à la concentration et est principalement localisé au domaine N-terminal (Tomee et al. 1997). Son rôle principal est de protéger les tissus contre l'inflammation en inhibant les protéases de l'hôte telles que la cathepsine G, l'élastase et la trypsine produites par les neutrophiles (Doumas et al. 2005). *In vitro*, l'antileucoprotéase inhibe la croissance de *C. albicans* (Tomee et al. 1997). Chez les patients séropositifs, la production de l'antileucoprotéase augmente face à l'infection au *Candida* et pourrait donc servir d'indicateur de la candidose oro-pharyngée (Chattopadhyay et al. 2004). L'antileucoprotéase pourrait jouer le rôle d'agent antiviral contre le VIH-1 par un mécanisme encore méconnu (Doumas et al. 2005). Bien que le mécanisme ne soit pas élucidé, il est possible que l'activité de l'anti-leucoprotéase se situe au niveau de la protéase virale. En effet,

l'anti-leucoprotéase pourrait inhiber le clivage des polyprotéines virales par la protéase, ce qui prévient la formation de protéines virales fonctionnelles. À concentration physiologique, l'activité de l'anti-leucoprotéase cause une réduction de 90% de la transcription inverse et serait une des causes du faible taux de transmission orale du VIH-1 (McNeely et al. 1995). *In vitro*, l'antileucoprotéase prévient l'infection des monocytes et des lymphocytes par le VIH-1 (Shugars et al. 1997, Hocini et al. 2000, Shine et al. 2002, Skott et al. 2002, Doumas et al. 2005).

Le lysozyme est une glycoprotéine de 14-15 kDa dont la cible est le peptidoglycane des parois cellulaires (Niyonsaba and Ogawa 2005). Le lysozyme est produit par les PMNs, les monocytes, les macrophages, les kératinocytes et les cellules de Paneth du petit intestin (Chen et al. 1986, Niyonsaba and Ogawa 2005). L'activité du lysozyme est principalement antibactérienne (Masschalck and Michiels 2003, Niyonsaba and Ogawa 2005). À faible concentration *in vitro*, le lysozyme inhibe la croissance de *C. albicans* et réduit l'activité et la quantité des Saps, tandis que l'effet fongicide n'est observé qu'à forte concentration et nécessite un contact prolongé (Wu et al. 1999, Woods et al. 2011). De plus, le lysozyme agit en synergie avec l'amphotéricine B, le kétoconazole et la nystatine lors du traitement de biofilm de *Candida* sur les prothèses dentaires fabriquées en acrylique (Samaranayake et al. 2009).

Deux peroxydases, la peroxydase salivaire et la myéloperoxydase, sont présentes dans la salive et catalysent l'oxydation du thiocyanate (SCN^-) en présence de H_2O_2 (Ihalin et al. 2006). La peroxydase salivaire est sécrétée par les glandes salivaires parotides et sous-mandibulaires tandis que les PMNs produisent la myéloperoxydase (Ihalin et al. 2006). *C. albicans* est sensible aux ions d'hypocyanate (OSCN^-) et à l'acide d'hypothiocyanate (HOSCN) produits par la peroxydase salivaire et la myéloperoxydase, mais la concentration physiologique de phosphate présente dans la salive inhibe leurs effets potentiellement antifongiques (Ihalin et al. 2006). Le rôle des peroxydases est plutôt la protection des cellules de l'hôte en retirant du milieu les radicaux libres et les molécules carcinogènes (Ihalin et al. 2006).

La muqueuse buccale

La muqueuse buccale constitue la première barrière de défense contre *C. albicans* et la desquamation de l'épithélium permet de retirer une partie des pathogènes qui y adhèrent. Cette barrière est composée de l'épithélium pavimenteux stratifié (kératinisé ou non-kératinisé) et de la lamina propria (Nanci and Ten Cate 2003).

Kératinocytes

Les kératinocytes sont situés dans l'épithélium et sont les premières cellules à entrer en contact avec *C. albicans*. Les kératinocytes détectent la présence du champignon grâce aux récepteurs TLR2, TLR4 et de KcMR, le récepteur du mannose spécifique aux kératinocytes (Pivarcsi et al. 2003). Les kératinocytes des couches supérieures de l'épithélium expriment davantage les récepteurs TLR2 et KcMR (Pivarcsi et al. 2004). L'activation de TLR2 et TLR4 déclenche la voie de signalisation de MyD88 et IRAK puis active le facteur de transcription NF- κ B, qui est impliqué dans la transcription de gènes de cytokines de la réponse inflammatoire tels que Il-1, Il-6, Il-8 (Pivarcsi et al. 2003, Pivarcsi et al. 2004). Chez la souris, la voie de signalisation de TGF- β est aussi nécessaire à l'expression de gènes sous le contrôle de NF- κ B, tel TNF- α (Hogan et al. 2013). En plus d'être une molécule chimotactique pour les kératinocytes, Il-1 réduit l'adhérence des bactéries aux kératinocytes et induit l'expression de la kératine 6, un marqueur des kératinocytes activés en prolifération (Komine et al. 2001, Grone 2002, Barrientos et al. 2008). La production autocrine d'Il-1 α augmente l'expression de S100A8 et S100A9 (Bando et al. 2013). Il-6 augmente la vitesse de renouvellement de l'épithélium par l'induction de la prolifération des kératinocytes (Barrientos et al. 2008). Il-6 et Il-8 recrutent les PMNs à l'épithélium du site d'infection (Grone 2002). TNF- α induit l'expression des cytokines Il-1, Il-6 et Il-8, favorise l'adhérence par la surexpression d'ICAM-1 et facilite l'apoptose des kératinocytes endomagés (Banno et al. 2004, Barrientos et al. 2008). NF- κ B contrôle aussi l'activation et la production des mécanismes antifongiques directs des kératinocytes : l'antileucoprotéase, les β -défensines et la synthase de monoxyde d'azote inductible (iNOS) (Pivarcsi et al. 2003, Pivarcsi et al. 2004). Ces mécanismes antifongiques sont augmentés en présence d'Il-1 et Il-8, ou par l'exposition des kératinocytes aux rayons UVB (Szolnoky et al. 2001). Chez l'humain et la souris, lors de l'infection, les kératinocytes sécrètent les cytokines immunomodulatrices Il-12 et Il-18 (Grone 2002). Les

kératinocytes murins peuvent aussi sécréter l'Il-10, une cytokine anti-inflammatoire (Grone 2002). Il-12 dirige la réponse immunologique vers l'axe Th1 par l'induction de la production d'IFN- γ tandis qu'Il-10 favorise l'axe immunologique Th2 (Grone 2002). Chez l'humain et la souris, Il-18 favorise et amplifie la réponse à l'IFN- γ (Stoll et al. 1997, Companjen et al. 2000). En présence d'IFN- γ , les kératinocytes sécrètent les cytokines Il-7 et Il-15, qui influencent respectivement la migration des lymphocytes T vers les ganglions lymphatiques et le recrutement vers l'épithélium (Grone 2002). Les kératinocytes ne produisent pas d'Il-4, Il-13 et Il-17, mais possèdent les récepteurs associés à ces cytokines (Grone 2002). Il-4 et Il-13 induisent l'expression d'Il-6 chez les kératinocytes et favorisent leur prolifération (Derocq et al. 1994, Wery et al. 1996). La présence d'Il-17 et d'IFN- γ dans le milieu favorise l'expression d'ICAM-1 chez les kératinocytes (Albanesi et al. 1999, Albanesi et al. 2000). De plus, Il-17 stimule la synthèse et la sécrétion d'Il-8 en fonction de la concentration, mais inhibe la production de RANTES (CCL5) (Albanesi et al. 1999, Bai et al. 2007). Chez les kératinocytes humains, Il-17 et/ou Il-22 augmentent l'expression de S100a8 et s100a9 *in vitro* (Boniface et al. 2005, Liang et al. 2006, Wilson et al. 2007). En synergie avec IFN- γ ou Il-4, Il-17 stimule la production d'Il-6, GM-CSF et GRO- α (Albanesi et al. 2000).

Neutrophiles polymorphonucléaires (PMNs)

Les PMNs sont des granulocytes à noyau multilobé et sont les premiers leucocytes à être recrutés au site d'une infection (Kennedy and DeLeo 2009). Les PMNs sont les leucocytes les plus nombreux du système immunitaire inné, et représentent 40 à 60% des leucocytes en circulation dans le sang (Woods et al. 1999, Kennedy and DeLeo 2009, Wright et al. 2010). Les PMNs sont activés et recrutés par GM-CSF, IFN- γ , Il-6, Il-8 et TNF- α (Wright et al. 2010). L'absence d'Il-6 ou de TNF- α diminue le recrutement des PMNs au site d'infection au *C. albicans* chez les souris K.O. pour ces cytokines (Kullberg et al. 1999). Les PMNs adhèrent à l'endothélium grâce à de nombreux récepteurs, dont la L-selectine, LFA-1, MAC-1 et VLA-4 (Kennedy and DeLeo 2009, Wright et al. 2010). La diapédèse vers le site infectieux est déclenchée par la présence de la molécule chimiotactique Il-8 (Wright et al. 2010). Au site d'infection, les PMNs phagocytent le champignon, déclenchent leurs mécanismes fongicides oxydatifs et non-oxydatifs et modulent la réponse inflammatoire par la sécrétion des cytokines Il-1, Il-6, Il-12, TGF- β et TNF- α (Wright et al. 2010). *In vitro*, les

PMNs produisent aussi de l'IL-17a en présence de *C. albicans* (Romani et al. 2008). La production d'espèces réactives de l'oxygène par le complexe protéique de la NADPH oxydase permet l'oxydation des glycoprotéines de surface et la fragmentation de l'ADN de *C. albicans*, ce qui amplifie l'effet fongicide causé par le largage des granules à l'intérieur des phagosomes (Kennedy and DeLeo 2009). Les granules contiennent des molécules cytotoxiques dont la lactoferrine, la myéloperoxydase, les défensines et la cathepsine G, qui dégradent les parois des hyphes de *C. albicans* (Christin et al. 1997, Kennedy and DeLeo 2009). En plus de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, les PMNs activés en présence de GM-CSF, IL-3 et IFN- γ peuvent activer les lymphocytes T par la présentation antigénique sur le CMH de classe II et l'expression des molécules de co-stimulation (Wright et al. 2010). Les neutrophiles humains peuvent recruter les lymphocytes Th17 au site d'infection par la production des chimiokines CCL2 et CCL20 (Pelletier et al. 2010). Cependant, malgré le fait que les PMNs éliminent *C. albicans in vitro*, leur présence n'est pas essentielle *in vivo* pour le contrôle de la candidose oro-pharyngée chez la souris transgénique exprimant le génome du VIH-1 (Marquis et al. 2006).

Cellules NK (Natural Killer)

Les cellules NK proviennent de la lignée des cellules lymphoïdes. Leur rôle principal est de limiter la propagation de virus ou de tumeurs jusqu'à l'activation du système immunitaire adaptatif (Murciano et al. 2006). Les cellules NK, activées par l'IL-2 et l'IFN- γ , produisent GM-CSF, TNF- α et IFN- γ afin d'activer les cellules phagocytaires (Arancia et al. 1998, Murciano et al. 2006). Même si les cellules NK se lient à la paroi cellulaire de *C. albicans* par la molécule CD11b/CD18, les cellules NK n'inhibent généralement pas la croissance de *C. albicans* et ne tuent pas le champignon (Zunino and Hudig 1988, Arancia et al. 1998, Murciano et al. 2006, Vonk et al. 2006). Cependant, les formes levure et hyphes de *C. albicans* inhibent la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK alors que les cellules NK traitées à l'aide de cette cytokine démontrent une légère activité fongicide contre la forme levure de *Candida* (Mathews and Witek-Janusek 1998, Murciano et al. 2006).

Cellules de Langerhans

Découvertes en 1868 par Paul Langerhans, les cellules de Langerhans sont des cellules principalement de la lignée myéloïde et proviennent de la moelle osseuse (Berger et al. 2006, Romani et al. 2010). Leur rôle est d'assurer la liaison entre l'immunité innée et adaptative. Les cellules dendritiques requièrent Il-4 et GM-CSF afin de se spécialiser en cellules de Langerhans qui possèdent la capacité de s'auto-renouveler (Merad et al. 2002, Berger et al. 2006). Afin de remplacer les cellules de Langerhans migrant aux organes lymphoïdes secondaires lors d'une inflammation, les monocytes de la périphérie se différencient en cellules de Langerhans en présence d'Il-4, GM-CSF, TGF- β et du ligand de Notch δ -1 (Berger et al. 2006, Romani et al. 2010). Les cellules de Langerhans sont localisées dans les couches basales et supra-basales de l'épiderme et des muqueuses, où elles peuvent entrer en contact avec des pathogènes par l'extension de leurs dendrites (de Repentigny et al. 2004, Kaplan et al. 2008, Romani et al. 2010). Les cellules de Langerhans situées à l'épithélium ont un phénotype immature favorisant la phagocytose et la macropinocytose (Berger et al. 2006, Cunningham et al. 2008). La migration des cellules de Langerhans vers l'épithélium est assurée par la liaison, à l'aide de CCR6, de la molécule chimiotactique MIP-3 α (CCL20) produite par les kératinocytes (Berger et al. 2006). Les cellules de Langerhans expriment plusieurs molécules à leur surface, notamment le CMH de classe I et II, CD11b, CD11c et CD45. L'expression de la E-cadherine permet aux cellules de Langerhans de former un réseau avec les kératinocytes (Cunningham et al. 2008). Les cellules de Langerhans expriment TLR2, TLR4 ainsi qu'un récepteur de lectine de type C, la langerine (CD207) (Cunningham et al. 2008). La liaison d'un antigène à l'un des PRR déclenche le programme de maturation des cellules de Langerhans, qui diminue la fréquence de la phagocytose et l'expression de la E-cadherine (Cunningham et al. 2008). La molécule CCR7 est alors exprimée, favorisant la migration des cellules de Langerhans vers les organes lymphoïdes secondaires (Kaplan et al. 2008). Les cellules de Langerhans deviennent matures durant le transit par le réseau lymphatique et augmentent l'expression du CMH de classe I et II ainsi que des molécules de co-stimulation CD54, CD58, CD80 et CD86 (Kaplan et al. 2008, Haley et al. 2012). La réponse immunitaire est remplacée par l'induction de la tolérance si la cellule de Langerhans n'exprime pas les molécules de co-stimulation mais présente des molécules du soi sur le CMH de classe I et II (Waithman et al. 2007). Dans les organes lymphoïdes secondaires, la

présentation des antigènes de *C. albicans* aux lymphocytes T naïfs et mémoires est accompagnée de la production d'Il-1 β , Il-6, Il-17, Il-22, Il-23, IFN- γ et TGF- β (Haley et al. 2012). La transcription de ces cytokines est dépendante de la voie de signalisation de MyD88 et de TLR2, et la sécrétion d'Il-1 β , Il-6, Il-23 et TGF- β favorise la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocytes Th17 (Aliahmadi et al. 2009, Haley et al. 2012, Hernandez-Santos and Gaffen 2012). De plus, dans un modèle murin de la candidose cutanée, la présentation d'antigènes provenant de *C. albicans* par les cellules de Langerhans est nécessaire et suffisante à la différenciation de lymphocytes Th17 spécifiques aux antigènes du champignon (Igyarto et al. 2011).

Macrophages

Les macrophages sont des cellules de la lignée myéloïde provenant de la différenciation des monocytes circulant dans le sang. Les macrophages de la muqueuse buccale sont situés dans la lamina propria. Les macrophages humains et murins expriment plusieurs molécules telles que le CMH de classe I et II, CD11b, CD45, le récepteur Fc et les récepteurs du complément (Barbeau and Deslauriers 1989, Vazquez-Torres and Balish 1997, de Repentigny et al. 2004). Les macrophages murins expriment aussi la molécule F4/80 (Hamann et al. 2007). Afin de détecter la présence de pathogènes, les macrophages expriment une grande quantité de PRRs, dont le récepteur du mannose (MMR, CD206), dectine-1, dectine-2, TLR1-9 et TLR11-12 (Doan 2008, Saijo and Iwakura 2011). Parmi ces récepteurs, dectine-1, dectine-2, TLR2 et TLR4 sont particulièrement importants pour la détection de *C. albicans* (de Repentigny et al. 2004, Saijo et al. 2010, Saijo and Iwakura 2011).

Les macrophages possèdent deux programmes d'activation (M1 et M2) ainsi qu'un programme de désactivation (Gordon 2003, Martinez et al. 2009). L'activation et la polarisation complète d'un macrophage vers l'un de ces trois programmes nécessite la détection d'un pathogène par les PRRs et la présence de cytokines spécifiques (Martinez et al. 2009). Le programme d'activation classique M1 est induit par la détection d'un pathogène en présence d'IFN- γ , tandis que la présence d'Il-4 ou Il-13 conduit au programme d'activation alternatif M2 (Mantovani et al. 2004, Martinez et al. 2009). Il-21 et Il-33 amplifient la réponse des macrophages à l'Il-13 (Mantovani et al. 2013). La présence d'Il-10 déclenche le programme de désactivation et cause l'anergie du macrophage par l'inhibition de la production

de cytokines pro-inflammatoires et de la poussée oxydative (Gordon 2003, Mantovani et al. 2004). Le programme d'activation classique M1 confère aux macrophages un effet fongicide contre *C. albicans* qui est amplifié par la présence de GM-CSF (Vazquez-Torres and Balish 1997). La forme hyphe du champignon est cependant plus résistante aux effets fongicides des macrophages que la forme levure (Vazquez-Torres and Balish 1997). Par ailleurs, la forme hyphe de *C. albicans* induit la production d'Il-1 β , alors que les formes hyphe et levure déclenchent la production d'Il-6 et Il-23 chez les macrophages (Joly et al. 2009, Gow et al. 2012). Le programme M1 est caractérisé par la production des cytokines Il-1 β et Il-6, qui favorisent la réponse immunitaire de type Th17, ainsi que des cytokines Il-12, Il-15, Il-18, et TNF- α (Hernandez-Santos and Gaffen 2012, Schwartz and Svistelnik 2012). L'action combinée d'Il-12 et Il-18 permet la production autocrine d'IFN- γ et l'activation des macrophages humains et murins (Munder et al. 1998, Darwich et al. 2009). En plus de recruter les PMNs au site d'infection, la production autocrine de TNF- α induit le mécanisme fongicide principal des macrophages, soit la production d'espèces réactives de l'oxygène (O₂⁻, H₂O₂) et de monoxyde d'azote (NO) (Vazquez-Torres and Balish 1997, de Repentigny et al. 2004, Mantovani et al. 2004). Les macrophages M1 produisent les molécules antifongiques calprotectine et les défensines (de Repentigny et al. 2004).

Le programme d'activation alternatif M2 est impliqué dans la résolution d'infections parasitaires ainsi que l'angiogenèse tissulaire suite à une infection (Mantovani et al. 2004, Martinez et al. 2009, Sica and Mantovani 2012). Ce programme est caractérisé par l'augmentation de la phagocytose, l'endocytose, l'autophagie et l'utilisation de la voie de l'arginase (Mosser 2003, Mantovani et al. 2004, Sica and Mantovani 2012). Les macrophages de type M2 augmentent l'expression du CMH de classe II et du récepteur du mannose (Stein et al. 1992, Gordon and Martinez 2010, Sica and Mantovani 2012). La production d'Il-10 est aussi augmentée, tandis que la production des cytokines pro-inflammatoires Il-1 β , Il-6 et TNF- α est abaissée (Mosser 2003, Mantovani et al. 2004, Gordon and Martinez 2010).

La plasticité des macrophages incite à la prudence quant au paradigme M1 et M2. En effet, la polarisation des macrophages ne semble pas finale, et les macrophages peuvent donc changer de phénotype en réponse au microenvironnement *in vitro* et *in vivo* (Stout et al. 2005, Sica and Mantovani 2012, Davis et al. 2013). Afin de tenir compte de la plasticité des macrophages, les phénotypes M1 et M2 ne devraient pas être considérés comme des absolus,

mais plutôt comme les extrêmes entre lesquelles les macrophages se situent en fonction de leur environnement (Gordon and Martinez 2010, Mantovani et al. 2013).

Chez la souris transgénique exprimant le génome du VIH-1, la réponse des macrophages est largement préservée, même si ceux-ci semblent exprimer un phénotype intermédiaire incorporant des caractéristiques provenant des types M1 et M2 (Goupil et al. 2009). La perturbation et l'amalgame des phénotypes M1 et M2 sont aussi observées chez les humains infectés au VIH-1 (Cassol et al. 2010, Chihara et al. 2012).

Lymphocytes B

Les lymphocytes B ont pour origine la moelle osseuse. Les lymphocytes B immatures expriment les anticorps d'isotype IgM à leur surface cellulaire, tandis que les lymphocytes B matures naïfs expriment aussi l'isotype IgD. La détection de l'antigène spécifique par les lymphocytes B déclenche la différenciation en lymphocytes B mémoires et en plasmocytes sécréteurs d'anticorps. Normalement, la muqueuse buccale ne contient pas de lymphocytes B, et ceux-ci jouent un rôle mineur contre la candidose en favorisant l'opsonisation et la phagocytose de *Candida* (van Loon et al. 1989, Fidel 2002). Les lymphocytes B sont activés lors de la détection d'antigènes dérivés du mannane de *C. albicans*, mais les anticorps anti-mannane produits par les lymphocytes B n'exercent aucun effet protecteur contre la candidose (Mangeny et al. 1989, Fidel 2002). Par ailleurs, les souris ainsi que les patients atteints de déficiences des lymphocytes B ne présentent pas une susceptibilité accrue à la candidose oropharyngée ou systémique d'origine endogène (Rogers and Balish 1980, Sinha et al. 1987, Wagner et al. 1996).

Lymphocytes T

Les lymphocytes T immatures ont pour origine les cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse (Janeway 2003). Les lymphocytes T immatures subiront « l'éducation thymique », qui permettra la prolifération et la différenciation de lymphocytes T naïfs exprimant chacun un récepteur TCR (*T-Cell Receptor*) unique, ainsi que l'apoptose des lymphocytes T auto-réactifs (Janeway 2003). Les lymphocytes T naïfs de la périphérie expriment tous les molécules CD3 et CD45 et se subdivisent en sous-population de lymphocytes T CD8⁺ ainsi qu'en sous-population de lymphocytes T CD4⁺ αβ ou γδ, en

fonction des chaînes polypeptidiques de leur TCR (Janeway 2003). Les lymphocytes T $\alpha\beta$ constituent la majorité des lymphocytes T CD4⁺ (Janeway 2003). Les lymphocytes T naïfs expriment constitutivement le récepteur CCR7, ce qui permet leur migration vers les organes lymphoïdes secondaires (Sallusto et al. 1999, Scherpereel et al. 2013). Les lymphocytes T sont recrutés au site d'infection de la muqueuse buccale par Il-8, MCP-1, MDC (*macrophage-derived chemokine*), MIP-1 α , MIP-1 β et RANTES (CCL5) (D'Ambrosio et al. 2001, Roda et al. 2006). Les lymphocytes T sont situés principalement des deux côtés de la membrane basale de la muqueuse buccale, soit dans la couche basale de l'épithélium et la région superficielle de la lamina propria (van Loon et al. 1989). Chez l'humain, la plupart de ces cellules sont des lymphocytes T mémoires exprimant la molécule CD45R0 (Colasante et al. 1992). Le ratio d'un lymphocyte T CD4⁺ pour deux lymphocytes T CD8⁺, observé dans la muqueuse buccale chez l'humain, est inversé chez la souris (van Loon et al. 1989, Bolduc et al. 1990). Cependant, l'humain et la souris répondent à la candidose par le recrutement des mêmes populations cellulaires (Lewandowski et al. 2006).

Tableau I - Les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺

Sous-populations	Cytokines de différenciation	Facteurs de transcription	Principales cytokines produites
Th1	IFN- γ , Il-12	STAT-1, STAT-4, T-bet	IFN- γ
Th2	Il-4	GATA-3, STAT-6	Il-4, Il-5, Il-13
Th9	Il-4, TGF- β	PU-1	Il-9
Th17	Il-1 β , Il-6, Il-21, (Il-23), TGF- β	ROR- γ t, (RORc), STAT-3	Il-17A, Il-17F, Il-21, Il-22
Th22	Il-6, TNF- α	AhR	Il-22, TNF- α
Tfh*	Il-6, Il-21	BCL6, c-Maf	Il-21
<i>i</i> T-reg	Il-2, TGF- β	Foxp3, STAT-5	Il-10, Il-35, TGF- β

* Les cellules Tfh nécessitent un contact avec les lymphocytes B

() Indique la variation entre (humain) et souris

Les lymphocytes T CD4⁺ sont classés en sous-populations en fonction des cytokines et des facteurs de transcription dirigeant leur différenciation. Les cytokines présentes dans l'environnement de ces cellules jouent un rôle majeur dans leur différenciation (Zhu et al.

2010). Chez l'humain, les sous-populations principales sont Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh (*T follicular helper*) et T-reg (Zhou et al. 2009, Zhu et al. 2010, Akdis et al. 2012, Coomes et al. 2013). La sous-population Th22 n'est pas encore clairement identifiée chez la souris. Les cellules Th1 sont impliquées dans l'immunité cellulaire contre les microorganismes intracellulaires alors que les cellules Th2 contrôlent la réponse humorale face aux pathogènes extracellulaires (Zhou et al. 2009). Les cellules Th17 favorisent l'élimination des bactéries et des champignons extracellulaires tandis que les cellules Tfh régulent la maturation et la réponse des lymphocytes B (Zhou et al. 2009). Les cellules Th9 et Th22 sont impliquées dans l'inflammation des tissus, et Th9 influence la production de mucus (Akdis et al. 2012). Les lymphocytes T régulateurs sont responsables de l'homéostasie et de la tolérance immunitaire et peuvent contrôler l'intensité de la réponse des autres sous-populations lymphocytaires (Romani 2008, Zhou et al. 2009). Chacune de ces différentes sous-populations produit un ensemble de cytokines spécifiques. Les cytokines et les facteurs de transcription requis pour la différenciation cellulaire, ainsi que les cytokines produites par les différentes sous-populations sont représentés au tableau 1 (Ivanov et al. 2006, Acosta-Rodriguez et al. 2007, Annunziato et al. 2009, Romagnani et al. 2009, Sakaguchi et al. 2009, Zhou et al. 2009, Eto et al. 2011, Akdis et al. 2012, Ma et al. 2012, Wu et al. 2012, Coomes et al. 2013, Tian et al. 2013).

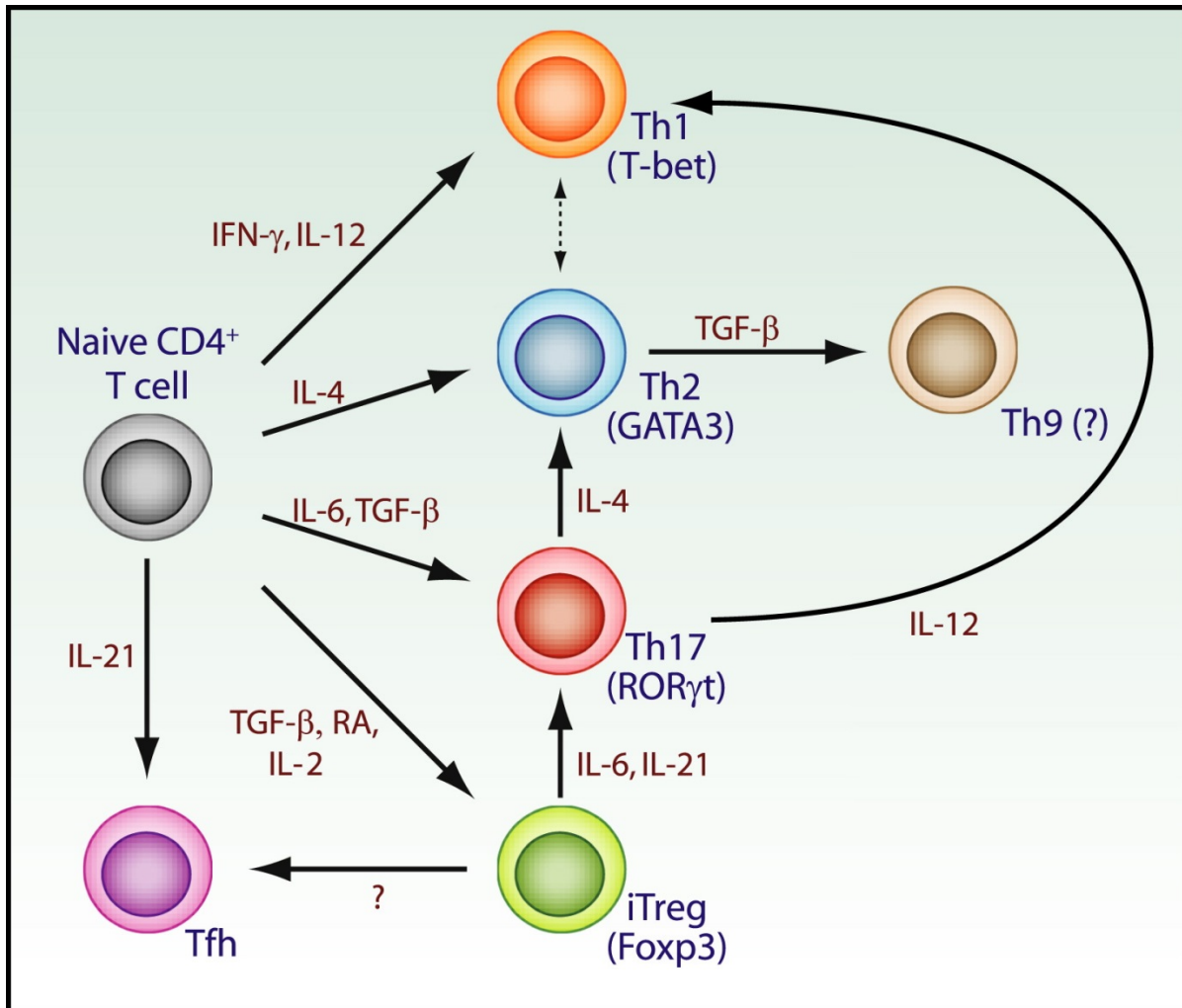


Figure 6. La plasticité des lymphocytes T CD4⁺ en fonction des cytokines présentes dans le milieu (Zhou et al. 2009). Reproduit avec permission (licence #3274410876517)

Il existe des divergences entre l'humain et la souris quant aux cytokines requises pour la différenciation des lymphocytes Th17 : les cellules Th17 humaines requièrent l'Il-23, tandis que chez la souris, l'Il-23 favorise le maintien du phénotype Th17 et la production d'Il-17 suite à la différenciation (Annunziato et al. 2009, Annunziato and Romagnani 2009). Les Tregs se subdivisent en deux sous-populations, les *n*Treg, différenciées dans le thymus en réponse aux antigènes du soi et modulant la tolérance envers le soi, et les *i*Treg, induites à la périphérie en réponse à un antigène exogène (Romani 2008, Coomes et al. 2013).

La différenciation des lymphocytes T CD4⁺ était autrefois considérée comme finale (Coomes et al. 2013). Il est maintenant accepté que les sous-populations de lymphocytes T

CD4⁺ sont plastiques, et peuvent, en présence des cytokines nécessaires, changer de phénotype *in vitro* et *in vivo* (Fig.6) (Zhou et al. 2009, Zhu et al. 2010, Coomes et al. 2013). En plus des cytokines présentes dans le microenvironnement, d'autres facteurs pourraient influencer le changement phénotypique, notamment l'expression de molécules de co-stimulation et de récepteurs de cytokines, la disponibilité des nutriments et son effet sur les voies métaboliques, ainsi que le ratio des facteurs de transcription (Coomes et al. 2013). Il existe aussi des populations lymphocytaires exprimant un double phénotype, telles que les cellules IL17⁺IFN- γ ⁺ (Th1Th17) ou les lymphocytes T Foxp3⁺ ROR- γ ⁺ (Acosta-Rodriguez et al. 2007, Luger et al. 2008, Zhou et al. 2009, Coomes et al. 2013). Les sous-populations Th17 et Tregs correspondent aux phénotypes les plus instables et donc plus prompts au changement de phénotype, tandis que Th1 et Th2 sont plus stables (Bending et al. 2009, Zhou et al. 2009, Coomes et al. 2013). Par ailleurs, il est plus difficile pour les sous-populations Th1 et Th2 de changer de phénotype après plusieurs rondes de réplication et il est plus facile pour toutes les sous-populations de changer de phénotype *in vitro* qu'*in vivo* (Coomes et al. 2013).

La présence des lymphocytes Th17 et des Tregs est nécessaire lors d'une réponse immunitaire efficace contre *C. albicans* (Hernandez-Santos and Gaffen 2012). Dans un modèle murin de candidose oro-pharyngée incluant une seconde infection au *Candida*, les lymphocytes Th17 et leur production d'Il-17 confèrent une résistance à long terme envers l'infection et accélèrent la résolution du deuxième épisode de candidose (Hernandez-Santos et al. 2013). Les souris Il-17RA^{-/-} et Il-23p19^{-/-} sont plus susceptibles à la candidose oro-pharyngée (Conti et al. 2009). Le co-transfert adoptif de lymphocytes Th17 et de Tregs chez la souris Rag^{-/-}, déficiente en lymphocytes B et T et très susceptible à la candidose oro-pharyngée, restaure l'immunité contre *Candida* (Hernandez-Santos and Gaffen 2012, Hernandez-Santos et al. 2013). Chez la souris, la déplétion des Tregs augmente la susceptibilité à la candidose (Pandiyan et al. 2011). La production d'Il-17 joue un rôle important lors de la candidose systémique (Huang et al. 2004, van de Veerdonk et al. 2010).

Les lymphocytes Th17 murins expriment les molécules CCR4, CCR6 et CXCR3 (Acosta-Rodriguez et al. 2007, Nakae et al. 2007, Cox et al. 2008, Koelink et al. 2012, Coursey et al. 2013, Moriguchi et al. 2013). Les cellules Th17 humaines n'expriment que CCR4 et CCR6, puisque CXCR3 est retrouvé chez les lymphocytes Th1 et les cellules Th1Th17 produisant de l'Il-17 et de l'IFN- γ (Nakae et al. 2007, Gosselin et al. 2010). De plus,

les lymphocytes Th17 humains et murins expriment Il-17a sur la membrane plasmique (Brucklacher-Waldert et al. 2009). Les lymphocytes Th17 sont l'une des sous-populations retrouvées le plus fréquemment au niveau des muqueuses et sont impliqués dans la résolution d'infections fongiques comme la candidose (Romani 2008, Conti et al. 2009, Zhou et al. 2009). La cytokine la plus importante des lymphocytes Th17, l'Il-17a, augmente la production des peptides antimicrobiens par la muqueuse buccale et permet le recrutement des PMNs au site d'infection par la production de chimiokines grâce au récepteur de l'Il-17 exprimé chez les kératinocytes, les fibroblastes, les macrophages, les cellules dendritiques ainsi que les lymphocytes B et T (Liang et al. 2006, Eyerich et al. 2010). Chez l'humain, les PMNs sont aussi recruté directement par les lymphocytes Th17 grâce à la production d'Il-8 (CXCL8) (Pelletier et al. 2010). La cytokine Il-22 stimule aussi la production des peptides antimicrobiens, mais Il-22 ne peut influencer les cellules du système immunitaire, car le récepteur de l'Il-22 est exprimé uniquement sur les cellules non-immunitaires (Wolk et al. 2004, Liang et al. 2006). Il-17a se lie directement au *C. albicans* par les protéines Crh11p et Gas1p du champignon et favorise l'agrégation et la filamentation de la levure (Zelante et al. 2012). Par ailleurs, *C. albicans* module la réponse immunitaire à son égard en réduisant la production d'Il-17 par la modification de la voie du tryptophane : en inhibant IDO (*Indoleamine 2,3-dioxygenase*), *C. albicans* favorise la production de 5-hydroxytryptophane par l'hydroxylase du tryptophane, ce qui inhibe la production d'Il-17 (Cheng et al. 2010). Le facteur, présumé soluble, permettant l'inhibition de la production d'Il-17 n'est pas encore identifié (Cheng et al. 2010, Hernandez-Santos and Gaffen 2012).

Les Tregs humains et murins expriment les molécules CD4 et CD25 à la surface plasmique ainsi que le facteur de transcription Foxp3, qui est utilisé comme marqueur intracellulaire (Sakaguchi et al. 2009). L'induction de la tolérance grâce à la régulation de la réponse immunitaire par les Tregs est essentielle dans l'immunité protectrice contre le *C. albicans* (Montagnoli et al. 2002, Rowe et al. 2012). En présence de *C. albicans*, les Tregs produisent les cytokines Il-4, Il-10 et TGF- β (Montagnoli et al. 2002). En plus de la production de TGF- β , les Tregs favorisent la différenciation de lymphocytes T naïfs en cellules Th17 lors de la candidose par la séquestration et la consommation de l'Il-2 nécessaire à leur propre prolifération *in vitro* et *in vivo* (Chen et al. 2011, Pandiyan et al. 2011). Chez la souris exprimant la toxine de la diphtérie sous le contrôle du promoteur Foxp3, la déplétion

des Tregs cause une baisse de la fréquence de cellules Th17 lors de la stimulation antigénique (Chen et al. 2011). Par ailleurs, *C. albicans* module la suppression de la réponse immunitaire par la liaison au récepteur TLR2 (Netea et al. 2004, Suttmuller et al. 2006). La liaison de *Candida* au TLR2 exprimé chez les cellules dendritiques induit la production d'Il-10 par ces cellules, et la liaison du champignon au TLR2 exprimé sur les Tregs favorise la prolifération et survie de cette sous-population et implique la voie de signalisation de MyD88 (Netea et al. 2004, Suttmuller et al. 2006). De plus, la sous-population Treg des souris TLR2^{-/-} est significativement réduite, et ces souris sont plus résistantes à la candidose systémique (Netea et al. 2004).

Les lymphocytes T CD8⁺ sont des cellules cytotoxiques utilisant deux mécanismes afin d'éliminer les pathogènes : l'induction de la mort cellulaire à l'aide de la voie de signalisation Fas/FasL et la relâche des molécules cytotoxiques perforine et granulysine (Goldsby and Goldsby 2003). L'effet principal des lymphocytes T CD8⁺ sur la candidose est la production de cytokines activant les mécanismes antifongiques des macrophages et des PMNs (de Repentigny et al. 2004). De plus, les lymphocytes T CD8⁺ cultivés en présence d'Il-2 inhibent directement la croissance des hyphes de *C. albicans in vitro* (Beno et al. 1995). Les lymphocytes T CD8⁺ réduisent les dommages tissulaires lors de la candidose systémique, et lysent les macrophages infectés par *Candida* (Farah et al. 2001). Chez la souris, la déplétion des lymphocytes T CD8⁺ par irradiation et l'utilisation d'anticorps anti-CD8 ne semble pas influencer la sévérité de la candidose orale (Farah et al. 2001). Cependant, en l'absence de lymphocytes T CD4⁺ chez la souris transgénique exprimant le génome du VIH-1, les lymphocytes T CD8⁺ exercent un effet protecteur contre la candidose oro-pharyngée (Marquis et al. 2006). De plus, dans le modèle de candidose oro-pharyngée avec une seconde infection, en l'absence de lymphocytes T CD4⁺, une production compensatoire d'Il-17 par les lymphocytes CD8⁺ et les lymphocytes CD3⁺ CD4⁻ CD8⁻ exerce un effet protecteur lors de la deuxième infection (Hernandez-Santos et al. 2013). Il existe aussi, chez l'humain, une sous-population de lymphocytes T mémoires CD8⁺ CD45RO⁺ exprimant le gène *Il17a* de façon dépendante de la voie de signalisation de la protéine kinase A (PKA) en présence de PMA (*Phorbol 12-myristate 13-acetate*) (Shin et al. 1999, Eyerich et al. 2010).

Chapitre 3 – Le virus de l’immunodéficience humaine

Épidémiologie du VIH

Le syndrome d’immunodéficience acquise (SIDA), décrit pour la première fois en 1981, est causé par le virus d’immunodéficience humaine (VIH), qui fut identifié en 1983 (Barre-Sinoussi et al. 1983). En 2011, 2,5 millions de nouveaux cas ont porté le nombre total de personnes infectées par le VIH à 34,2 millions, tandis que 1,7 millions de personnes sont décédées de la maladie (Piot and Quinn 2013). La région sub-saharienne de l’Afrique constitue la zone la plus affectée par le VIH, avec 63 % de la totalité des infections, suivie de l’Europe de l’Est et des Caraïbes (Vasan et al. 2006, Piot and Quinn 2013). Le VIH se transmet généralement lors de relations sexuelles non-protégées, de partage de matériel d’injection des drogues intraveineuses, et par la transmission verticale entre une femme séropositive et son nouveau-né. La transmission du virus par des relations hétérosexuelles cause 85 % des cas d’infection au VIH (Forsman and Weiss 2008). Les hommes ayant des rapports homosexuels, les travailleuses du sexe, les usagers de drogues injectables, les camionneurs, les marins et le personnel militaire représentent les groupes les plus à risque, et ceux-ci sont représentés en plus grande proportion dans la population totale d’individus infectés (Piot and Quinn 2013).

Deux virus peuvent causer le SIDA, le VIH-1 et le VIH-2 (Lucas et al. 1993, Fanales-Belasio et al. 2010). La quasi-totalité des cas sont causées par le VIH-1, le VIH-2 n’étant présent qu’à l’ouest et au centre de l’Afrique (Fanales-Belasio et al. 2010). Par ailleurs, le VIH-2, moins virulent que le VIH-1, progresse plus lentement vers la phase SIDA (Whittle et al. 1994, Fanales-Belasio et al. 2010). Le VIH-1 est divisé en trois sous-groupes : M (majeur), O (*outlier*) N (non-majeur, non-*outlier*) (Vasan et al. 2006). Les clades A-J du groupe M causent plus de 90 % des infections (Vasan et al. 2006). La répartition des clades A-J est hétérogène, puisque le clade B cause la majorité des infections en Amérique et en Europe, tandis que les clades A, C, D et G sont plus fréquents en Afrique (Goudsmit 1997, Vasan et al. 2006).

VIH-1

Le VIH-1 (Fig.7) est un rétrovirus appartenant au genre lentivirus, constitué de particules virales d'environ 100 nm de diamètre entourées d'une enveloppe lipidique formée à partir de la membrane plasmique de la cellule infectée (Gelderblom et al. 1989, Fanales-Belasio et al. 2010). La surface de l'enveloppe lipidique expose 72 trimères de la protéine gp120 liés de façon non-covalente à la protéine transmembranaire gp41, formant ainsi le complexe de la membrane virale (Gelderblom et al. 1989, Fanales-Belasio et al. 2010). La matrice est composée de la protéine p17 et est ancrée à la surface interne de l'enveloppe lipidique (Gelderblom et al. 1989, Fanales-Belasio et al. 2010). L'ARN viral simple brin de 9,8 kb, présent en deux copies liées à la nucléoprotéine p7, la transcriptase inverse p66 et l'intégrase p32 sont situés à l'intérieur de la capsidie qui est composée de la protéine p24 (Costin 2007, Fanales-Belasio et al. 2010). La protéase p11 est aussi présente à l'intérieur de la particule virale (Fanales-Belasio et al. 2010).

Le génome du VIH-1 (Fig.8) contient neuf gènes encadrés par deux régions non codantes (LTR, *Long Terminal Repeat*). Les gènes *gag*, *pol* et *env* sont les principaux gènes du VIH-1 et codent des précurseurs qui, une fois clivés par la protéase virale p11, formeront respectivement les protéines de structure de la capsidie, les enzymes essentielles à la réplication et les glycoprotéines de l'enveloppe (Fanales-Belasio et al. 2010). *Gag* code pour les protéines de structure p6, p7, p17 et p24, *pol* code la protéase p11, l'intégrase p32 et la transcriptase inverse p66 tandis que *env* code les protéines d'enveloppe gp41 et gp120 (Costin 2007, Fanales-Belasio et al. 2010). *Vpu* et *Vif* participent à la maturation du virus. *Vpu* est nécessaire lors de l'assemblage ainsi que de la relâche des particules virales, car *Vpu* internalise et séquestre la tétherine qui préviendrait la relâche des particules virales (Harris et al. 2012). De plus, *vpu* favorise la dégradation des molécules CD4 dans le réticulum endoplasmique. *Vif* favorise la maturation et l'infectivité du virus par la médiation de la polyubiquitination menant à la dégradation par le protéasome 26S des protéines APOBEC3, une famille d'enzymes causant l'hypermutation du génome viral (Strebel 2003, Harris et al. 2012). *Vpr* inhibe la division cellulaire en bloquant la cellule en phase G2, favorise la transcription du génome viral en se liant aux séquences LTR et permet la translocation vers le noyau de la cellule hôte de l'ARN viral double brin (Fanales-Belasio et al. 2010).

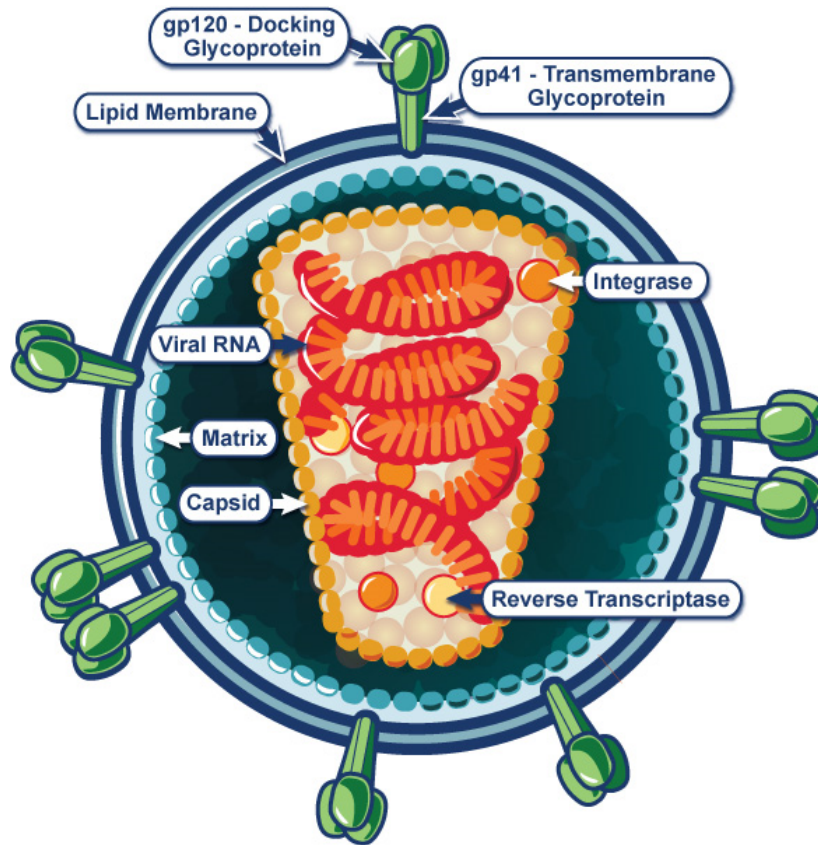


Figure 7. Structure du VIH-1

Courtesy: National Institute of Allergy and Infectious Diseases

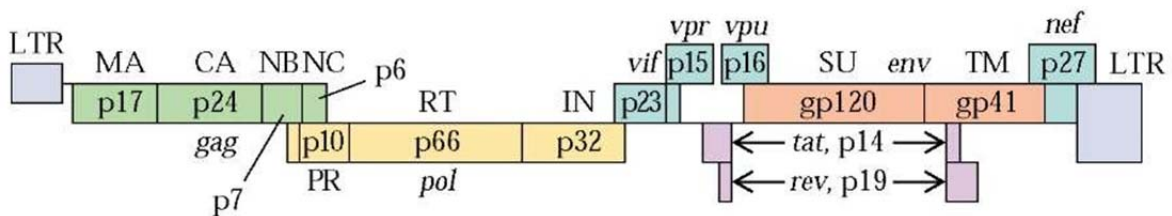


Figure 8. Le génome du VIH-1. Image modifiée provenant du site web

<http://what-when-how.com/acp-medicine/human-retroviral-infections-part-1/>

La transcription et la synthèse de l'ARN viral est favorisé par *tat* alors que la liaison de *rev* aux transcrits viraux non épissés permet la translocation de ceux-ci vers le cytoplasme de la

cellule hôte (Strebel 2003, Fanales-Belasio et al. 2010). *Nef* réduit l'expression des molécules du CMH de classe I et II ainsi que de la molécule CD4 à la surface des cellules hôtes (Fanales-Belasio et al. 2010). L'expression de plusieurs autres molécules est aussi influencée par *nef*. CD28 est internalisé par endocytose accélérée causée par la coopération de *nef* avec AP-1 et β -COP (Landi et al. 2011). Suite à l'infection, l'expression de CCR5 et CXCR4 est réduite à la surface de la cellule hôte par *nef*, possiblement afin de prévenir la surinfection (Landi et al. 2011). Par ailleurs, *nef* favorise la réplication virale en causant l'augmentation de la transcription des gènes codant pour les facteurs de transcription NF- κ B, NFATc, IRF-1, IRF-2, c-Fos et Jun-D ainsi que des cytokines IL-4, TGF- β , MIP-1 α et MIP-1 β (Swingler et al. 1999).

Infection au VIH-1

Le cycle de réplication du VIH-1 comprend six étapes : l'attachement et l'entrée du virus; la décapsidation; la transcription inverse du génome viral; l'intégration du provirus dans le génome de la cellule hôte; la synthèse des protéines et l'assemblage du virus; la relâche des particules virales (Fanales-Belasio et al. 2010).

L'attachement du VIH-1 débute par la liaison de la protéine virale gp120 à la molécule CD4 de la cellule hôte (Fanales-Belasio et al. 2010). Cette liaison déclenche un changement de conformation chez le complexe membranaire viral qui permet l'exposition du domaine de gp120 responsable de la liaison aux co-récepteurs du VIH-1, qui sont les récepteurs de chimiokines de la cellule hôte (Fanales-Belasio et al. 2010). Plusieurs molécules de l'hôte peuvent être utilisées comme co-récepteurs par le VIH-1 : CCR5, CXCR4, CCR1, CCR2b, CCR3, CCR8, CX3CR1, CXCR4, CXCR6, FPRL1, GPR1, GPR15, APJ, STRL33, D6 et l'intégrine α 4 β 7 (Gorry and Ancuta 2011, Monteiro et al. 2011). Les récepteurs les plus fréquemment utilisés sont CCR5 et CXCR4 (Fanales-Belasio et al. 2010). CCR5 est exprimé chez les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T activés, tandis que CXCR4 est exprimé chez les lymphocytes T (Bleul et al. 1997, Fanales-Belasio et al. 2010). Les ligands naturels de CCR5 sont les chimiokines RANTES, MIP-1a et MIP-1b (Raport et al. 1996, Fanales-Belasio et al. 2010). Le ligand naturel de CXCR4 est la

chimiokine SDF-1 (D'Apuzzo et al. 1997, Fanales-Belasio et al. 2010). La liaison du virus à la cellule hôte étant stabilisée par la double liaison de gp120 avec la molécule CD4 et un des corécepteurs, la protéine virale gp41 peut pénétrer la membrane plasmique de la cellule hôte et, par la formation d'une « *épingle à cheveux* », rapprocher les membranes plasmiques et virales, favorisant ainsi la fusion des membranes et l'entrée de la capsid virale à l'intérieur de la cellule hôte (Fanales-Belasio et al. 2010).

Le tropisme du VIH est déterminé en fonction de son affinité avec l'un des co-récepteurs (CCR5 et CXCR4) définis plus haut. Ainsi, le VIH-1 peut posséder un tropisme de type R5, X4 ou X4R5, en se liant à CCR5, CXCR4 ou les deux récepteurs (Forsman and Weiss 2008). Chez les virus de clade B, les primo-infections ont pour cause majoritaire les virus de tropisme R5, et un changement vers le tropisme X4 s'opère tardivement chez environ 50% des patients infectés (Forsman and Weiss 2008).

La décapsidation ayant relâché l'ARN viral à l'intérieur du cytoplasme, la transcriptase inverse p66 transcrit un brin d'ADN à partir du génome d'ARN viral jusqu'à la formation d'un hybride double brin ADN/ARN (Sarafianos et al. 2009, Fanales-Belasio et al. 2010). Ensuite, le site ribonucléase H de p66 décompose le brin ARN de l'hybride et p66 polymérise un deuxième brin d'ADN complémentaire (Sarafianos et al. 2009, Fanales-Belasio et al. 2010). L'intégrase p32 crée des « *bouts collants* » en clivant des nucléotides à l'extrémité 3' de chacun des brins d'ADN proviraux, puis orchestre le transfert de l'ADN proviral vers le noyau où p32 facilite son intégration au génome de la cellule hôte (Fanales-Belasio et al. 2010).

L'activation de la cellule hôte est nécessaire afin d'initier la transcription de l'ADN proviral en ARN génomique viral (Fanales-Belasio et al. 2010). En plus de l'ARN viral génomique, de longs ARNm codant pour les larges précurseurs de protéines virales sont exportés vers le cytoplasme où ils seront synthétisés (Fanales-Belasio et al. 2010). Deux brins d'ARN viraux génomiques s'associent avec les enzymes de réplication tandis que la capsid s'assemble autour d'eux (Fanales-Belasio et al. 2010). Les précurseurs de protéines virales contenus dans la capsid sont clivés par la protéase p11 durant la migration des particules virales immatures vers la surface cellulaire (Fanales-Belasio et al. 2010). Le bourgeonnement à partir de la surface cellulaire permet aux particules virales d'acquérir une enveloppe, qui

expose à sa surface gp120, gp41 ainsi que des molécules provenant de la cellule hôte (Fanales-Belasio et al. 2010). Les nouvelles particules virales sont directement relâchées dans l'espace extracellulaire lorsque la cellule hôte est un lymphocyte, tandis que lors de l'infection d'un monocyte ou d'un macrophage, les particules virales s'accumulent dans des vacuoles intracellulaires avant d'être relâchées (Fanales-Belasio et al. 2010).

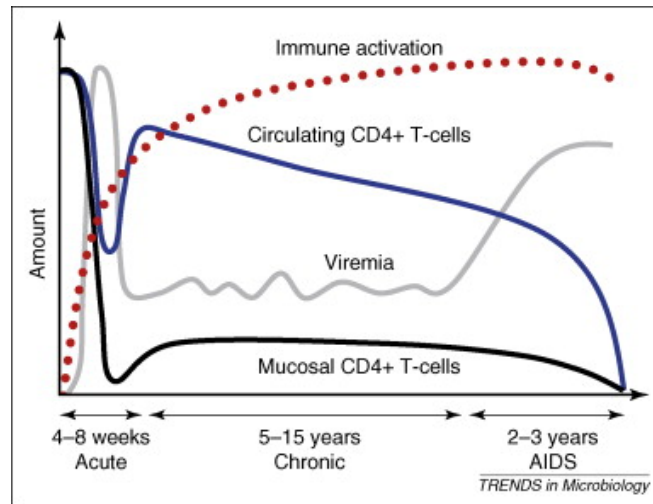


Figure 9. Progression de l'infection au VIH-1 vers la phase SIDA (Forsman and Weiss 2008). Reproduit avec permission (licence #3274411144433)

L'infection au VIH-1 est progressive et peut se diviser en trois phases principales, chacune ayant ses caractéristiques propres (Fig.9). La première phase, la primo-infection, est d'une durée d'environ quatre à huit semaines et est caractérisée par une grande charge virale et la déplétion des lymphocytes T CD4+ (Weiss 1993, Forsman and Weiss 2008). La première zone affectée, suite à la dissémination systémique du VIH-1, correspond aussi à la zone la plus sévèrement endommagée par l'infection, est le tissu lymphoïde associé à l'intestin (Forsman and Weiss 2008). L'intégrité de la barrière épithéliale intestinale est compromise et permet la translocation de bactéries vers le tissu lymphoïde, causant ainsi une forte réponse inflammatoire (Brenchley et al. 2006, Forsman and Weiss 2008). La séroconversion, le moment où, à la fin de la primo infection, la charge virale diminue considérablement marque le début de la phase chronique. Cette baisse est causée principalement par l'apparition de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques contre le VIH-1 (Forsman and Weiss 2008). L'absence de

nouvelles cellules cible, causée par la déplétion de lymphocytes T CD4⁺ CCR5⁺ dans le tissu lymphoïde de l'intestin, ainsi que l'action du complément jouent aussi un rôle dans la baisse de la virémie (Forsman and Weiss 2008). Durant la phase chronique, le renouvellement quotidien en lymphocytes T CD4⁺ permet de maintenir l'immunité malgré la réplication virale et ce, pendant une période variant entre cinq et quinze ans (Forsman and Weiss 2008). La vitesse de progression est influencée par la virémie durant cette période. Plus la virémie est élevée, plus rapide sera la progression vers la phase SIDA (Mellors et al. 1995, Forsman and Weiss 2008). La baisse du nombre de lymphocytes T CD4⁺ dans le sang sous 200 par microlitre marque le début de la phase SIDA (Forsman and Weiss 2008). À ce stade, l'activation chronique du système immunitaire causée par le VIH-1 perturbe le renouvellement efficace des lymphocytes T. L'immunité est compromise et les infections opportunistes affligent les individus atteints du VIH-1 en phase SIDA (Forsman and Weiss 2008).

Le VIH-1 perturbe le système immunitaire. La plus importante perturbation est la déplétion des lymphocytes T CD4⁺, puisque ceux-ci ne survivent que quelques heures suite à l'entrée du virus (Beck 2005, Forsman and Weiss 2008). Parmi les lymphocytes T CD4⁺, la sous-population Th17, qui exprime la molécule CCR6, subit une déplétion préférentielle causée par l'expression de CCR5, la surexpression de CXCR4 et $\alpha 4\beta 7$ et la faible production autocrine d'agonistes de CCR5 chez ces cellules (El Hed et al. 2010, Alvarez et al. 2013). Les lymphocytes T Th17 sont hautement permissifs à l'infection par le VIH-1 (Gosselin et al. 2010, Monteiro et al. 2011). Par ailleurs, la protéine nef du VIH-1 perturbe et active les voies de signalisation intracellulaires du TCR et du calcium de façon indépendante du TCR, et la production de granulysine est inhibée chez les lymphocytes T CD8⁺ par l'effet du VIH-1 sur la voie de signalisation JAK/STAT (Percario et al. 2003, Hogg et al. 2009). Le VIH-1 cause aussi la perte graduelle des lymphocytes T régulateurs (Prendergast et al. 2010).

Les cellules de Langerhans sont peu permissives à l'infection au VIH-1 grâce à l'expression de la langerine, qui cause l'internalisation et la dégradation des particules virales (Coleman and Wu 2009). Cependant, la co-infection du VIH-1 avec des microorganismes transmissibles sexuellement tels que *Neisseria gonorrhoeae* ou *Candida albicans* favorise l'infection des cellules de Langerhans (Coleman and Wu 2009). L'infection au VIH-1 cause des défauts de maturation des cellules de Langerhans : la baisse de l'expression du CMH de

classe I et II, des molécules de co-stimulation CD80 et CD86, la réduction de la production des cytokines IFN- γ et IL-12 ainsi que la diminution du nombre de dendrites et de granules de Birbeck (de Repentigny et al. 2004). Éventuellement, le VIH-1 cause une déplétion presque complète des cellules de Langerhans (de Repentigny et al. 2004).

Le VIH-1, par l'entremise de la protéine de la matrice p17, favorise la migration des cellules dendritiques plasmacytoïdes vers les ganglions lymphatiques par l'expression de CCR7, qui est une caractéristique des cellules dendritiques matures (Fiorentini et al. 2008, Coleman and Wu 2009). Toutefois, les cellules dendritiques plasmacytoïdes infectées n'acquièrent pas d'autres aspects des cellules matures, tel que l'expression de CD80, CD83, CD86 et du CMH de classe II (Fiorentini et al. 2008). Les cellules dendritiques plasmacytoïdes infectées par le VIH-1 présentent donc un phénotype immature caractérisé par l'absence de molécules de co-stimulation, ce qui peut induire la tolérance (Ohl et al. 2004, Fiorentini et al. 2008). Par ailleurs, le VIH-1 peut inhiber la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ ou promouvoir leur différenciation en Tregs par l'induction de IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase) chez les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Boasso et al. 2007, Manches et al. 2008).

Les macrophages, bien qu'infectés par le VIH-1, ne subissent pas de déplétion au cours de la maladie, car les macrophages sont des réservoirs pour le VIH-1 et résistent donc à la mort cellulaire (Vazquez et al. 2005). Ils présentent cependant des défauts de présentation d'antigène par CMH de classe I et II ainsi que des altérations des mécanismes de chimiotactisme perturbant la migration (Polyak et al. 1997). Chez les macrophages, Nef induit un stade d'activation chronique par l'activation de NF- κ B et STAT1 causant l'augmentation de la production de IL-1 β , IL-6 et TNF- α (Federico et al. 2001, Olivetta et al. 2003, Percario et al. 2003). MIP-1 α et MIP-1 β sont également produites et relâchées dans le milieu, ce qui active STAT3 et facilite davantage l'activation des macrophages (Percario et al. 2003). Gp120 réduit l'expression de CD4 à la surface cellulaire par la production de la cytokine pro-inflammatoire TNF- α (Herbein et al. 2010). L'activation chronique des macrophages ainsi que la co-infection de ceux-ci par un second pathogène opportuniste tel que *Mycobacterium avium* amplifie la transcription du génome viral et favorise la production de nouvelles particules virales (Vazquez et al. 2005).

Les PMNs ne sont pas infectés par le VIH-1. Le recrutement et les fonctions effectrices des PMNs semblent peu perturbés dans un modèle murin de candidose chez la souris transgénique exprimant le génome du VIH-1, puisque ceux-ci sont recrutés normalement à la muqueuse buccale et conservent leurs capacités fongicides (Marquis et al. 2006). Cependant, une réduction des capacités fongicides contre *Candida albicans* est observée chez les patients infectés au VIH-1 (Vecchiarelli et al. 2000, Beck 2005). De plus, les effets du VIH sur la poussée oxydative demeurent incertains, chacune des études rapportant des conclusions contradictoires (Beck 2005).

Les composantes de la salive sont aussi affectées par l'infection au VIH-1. Le flux salivaire est réduit d'environ 40% chez les individus infectés par le VIH-1 (Lin et al. 2001). Les études ne s'accordent pas sur la hausse ou la baisse des concentrations d'histatines, de lysozyme, de lactoferrine et d'IgA sécrétés (Lin et al. 2001). Ces divergences sont probablement causées par la technique de prélèvement de la salive ainsi que de la phase d'infection à laquelle se retrouvent les patients (Lin et al. 2001). Les cytokines présentes dans la salive des individus infectés au VIH-1 sont associées à un phénotype de réponse immunitaire de type Th2 (de Repentigny et al. 2004).

Traitement

Il existe cinq classes d'antirétroviraux utilisés dans le traitement de l'infection au VIH : les analogues de nucléosides, les inhibiteurs de la transcriptase inverse, les inhibiteurs de la protéase, les inhibiteurs de l'entrée virale et les inhibiteurs de l'intégrase (Altfeld et al. 2012). Les analogues de nucléosides entrent en compétition avec les nucléosides physiologiques et leur intégration dans la chaîne d'ADNc virale stoppe la polymérisation du brin d'ADN (Altfeld et al. 2012). Les inhibiteurs de la transcriptase inverse se lient à la transcriptase virale près du site de liaison des nucléosides et ralentissent la réaction de polymérisation (Altfeld et al. 2012). Les inhibiteurs de la protéase se lient directement au site actif de l'enzyme et préviennent le clivage des précurseurs transcrits par les gènes *gag* et *pol* en protéines fonctionnelles (Altfeld et al. 2012). Certains inhibiteurs de l'entrée virale préviennent la liaison de gp120 avec la molécule CD4 ou les corécepteurs CCR5 et CXCR4 alors que

d'autres bloquent p41, ce qui inhibe la fusion du virus avec la cellule hôte (Altfeld et al. 2012). L'intégrase est une cible de choix, car il n'y a pas d'intégrase dans les cellules humaines. Les inhibiteurs de l'intégrase virale bloquent l'intégration du génome viral dans le génome de la cellule hôte en inhibant une des étapes d'intégration suivantes : la liaison entre l'intégrase et l'ADN viral, l'édition en 3' du brin d'ADN ou la translocation de l'ADN génomique viral dans le noyau (Altfeld et al. 2012).

Le traitement utilisé, nommé HAART (*Highly Active Antiretroviral Therapy*), consiste en la combinaison de plusieurs antirétroviraux appartenant à des classes différentes. Le « cocktail » est généralement composé de deux analogues de nucléotides et/ou d'inhibiteurs de la transcriptase inverse ainsi que d'un inhibiteur de protéase (Altfeld et al. 2012). Malheureusement, le traitement cause plusieurs effets secondaires, tels que la lipodystrophie, la neuropathie, les pancréatites, les maux de tête, la fatigue, les nausées, les vomissements et la diarrhée (Max and Sherer 2000, Altfeld et al. 2012). Le coût du traitement est très élevé : entre 13 000 et 23 000 US\$ annuellement, en fonction de la combinaison d'antirétroviraux utilisée (Altfeld et al. 2012).

Chapitre 4 – Modèles d'études de la candidose oro-pharyngée

Les considérations éthiques et la variabilité entre les humains (diète, statut immunitaire, etc) favorise le recours à un modèle animal (Samaranayake and Samaranayake 2001, Naglik et al. 2008). Le modèle animal évite le prélèvement de biopsies tissulaires chez les humains, et permet de contrôler l'animal ainsi que son environnement, rendant ainsi possible l'analyse longitudinale de l'interaction hôte-pathogène (de Repentigny 2004, Naglik et al. 2008).

La candidose peut être étudiée chez une variété d'hôtes incluant *Drosophila melanogaster*, *Galleria mellonella*, *Caenorhabditis elegans*, la souris, le rat (Sprague-Dawley et Wistar), le lapin, le cobaye, le cochon gnotobiotique et le singe (Samaranayake and Samaranayake 2001, de Repentigny 2004, Steinbach and Zaas 2004, Chamilos et al. 2007, Naglik et al. 2008, Junqueira 2012, Costa et al. 2013). Les candidoses gastro-intestinale, oro-pharyngée et vaginale sont habituellement étudiées à l'aide d'un modèle murin, car il existe de nombreux réactifs immunologiques disponibles chez la souris et ces animaux sont facilement disponibles (de Repentigny 2004, Costa et al. 2013). De plus, la flore buccale normale des souris est connue (Trudel et al. 1986, Samaranayake and Samaranayake 2001). Par ailleurs, la génération de souris transgéniques et/ou K.O. permet d'analyser l'effet de perturbations immunologiques spécifiques, telles que celles causées par l'infection au VIH (de Repentigny 2004). Il n'existe aucun modèle de candidose orale chez les invertébrés (Junqueira 2012). *C. albicans* n'étant pas une espèce commensale chez la souris, il est nécessaire de perturber l'immunité de l'animal afin d'obtenir la colonisation par le champignon. Les paragraphes suivants traiteront des modèles murins de la candidose oro-pharyngée.

Il est possible de perturber l'immunité chez la souris normale par un traitement exogène. Habituellement utilisé lors de l'étude de l'efficacité de médicaments antifongiques, l'immunosuppression à l'aide de cortisone sous-cutanée permet de reproduire chez la souris la candidose oro-pharyngée observée chez l'humain (Kamai et al. 2001). Une variation de ce modèle fut récemment utilisée lors d'une étude sur l'efficacité des nanoparticules de nystatine

dans le contexte de la candidose oro-pharyngée (Melkoumov et al. 2013). L'ajout de tétracycline dans l'eau des souris en plus de l'immunosuppression à l'aide de cortisone cause l'élimination de la flore buccale normale et résulte en une candidose orale persistante, comprenant les lésions blanches caractéristiques de la candidose pseudomembraneuse à la surface de la langue (Takakura et al. 2003). Le traitement hebdomadaire de souris BALB/c par l'injection intramusculaire et sous-cutanée de 5 µg d'œstrogène permet la colonisation par *C. albicans* des muqueuses buccale et vaginale pour une durée d'environ cinq semaines (Rahman et al. 2007). L'injection d'œstrogène augmente la production de glycogène (source nutritive pour *C. albicans*) dans l'épithélium vaginal et facilite l'adhérence et la formation d'hyphes par le champignon (Ferrer 2000, Hamad 2014). L'injection chez les souris C57BL/6 du virus de la leucémie murine cause le syndrome d'immunodéficience acquise murin (SIDAM) (Deslauriers et al. 1997). Le SIDAM exhibe plusieurs défauts immunologiques similaires au SIDA, sans la longue période de latence, et permet la colonisation et l'infection de la muqueuse buccale par *C. albicans* (Deslauriers et al. 1997). L'induction de la xérostomie (sécheresse buccale) par l'ablation chirurgicale des glandes salivaires produit une candidose orale dont la sévérité dépend du nombre d'inoculations (Totti et al. 2004). L'irradiation (800 rad) de la tête et du cou de la souris, complémentée par l'utilisation d'un anticorps anti-CD4, permet d'obtenir une candidose orale persistante (Farah et al. 2001).

Certaines lignées de souris sont susceptibles à la candidose oro-pharyngée. Les souris athymiques nu/nu (souris « *nude* ») reproduisent une maladie similaire au syndrome de DiGeorge chez l'humain causée par la déplétion des lymphocytes de la rate et des organes lymphoïdes secondaires, ce qui permet l'établissement d'une candidose oro-pharyngée chronique ou d'une candidose gastro-intestinale (Balish et al. 1990, Farah et al. 2002). Les souris « *beige* » bg/bg sont affectées par un trafic vésiculaire défectueux chez les granulocytes causant l'apparition de granules de taille anormale, ce qui reproduit le syndrome humain de Chediak-Higashi (Blume et al. 1969, Spritz 1998). Les fonctions des cellules NK chez les souris bg/bg sont également perturbées (Roder and Duwe 1979). Suite à l'inoculation à *C. albicans*, ces souris présentent une infection modérée du tractus gastro-intestinal, mais une forte sensibilité aux infections systémiques (Cantorna and Balish 1990). Les souris possédant en combinaison les deux déficiences nu/nu et bg/bg sont plus susceptibles à la candidose oro-

pharyngée que les souris ayant une seule déficience et peuvent développer une candidose systémique d'origine endogène 12 à 16 semaines suivant la colonisation et l'infection de la muqueuse buccale (Cantorna and Balish 1990). L'infection au *Candida* est d'ailleurs létale chez les animaux nu/nu bg/bg (Cantorna and Balish 1990). La recombinaison des gènes codant pour les récepteurs d'antigènes chez les souris SCID (*Severe Combined Immune Deficiency*) est sévèrement perturbée, ce qui résulte en l'inhibition du développement des lymphocytes B et T (Bosma and Carroll 1991, Pla and Mahouy 1991). Bien qu'utilisées généralement dans le cadre d'une reconstitution lymphocytaire syngénique, allogénique ou humaine ainsi que lors de la greffe de tumeurs allogéniques ou xénogéniques, les souris SCID peuvent aussi être inoculées au *C. albicans* et vont alors développer une candidose oro-gastro-intestinale (Bosma and Carroll 1991, Pla and Mahouy 1991, Balish et al. 1993, Clemons and Stevens 2000).

La génération de souris *knockout* (K.O.) permet de cibler et d'éliminer un compartiment ou une fonction précise de l'immunité. Les souris K.O. sont donc utilisées afin d'étudier les effets d'une population cellulaire, d'un récepteur ou d'une cytokine. Certaines souris K.O. favorisent l'établissement d'une candidose oro-pharyngée. Les souris K.O. pour la chaîne δ ou α du TCR sont respectivement déficientes en lymphocytes T $\gamma\delta$ et $\alpha\beta$ (Jones-Carson et al. 2000). Ces souris, particulièrement les souris K.O. de la chaîne δ , sont sensibles à la candidose oro-pharyngée (Jones-Carson et al. 2000). L'infection du tractus gastro-intestinal de ces deux souris K.O. par *C. albicans* n'est pas létale chez les souris adultes et elles ne développent pas de candidose systémique (Jones-Carson et al. 2000). Les souris K.O. pour la β 2-microglobuline manifestent une candidose oro-pharyngée légère une à deux semaines suivant la colonisation de la muqueuse buccale et l'infection du tractus gastro-intestinal par *Candida* (Balish et al. 1996). Les souris IL-12/IL-23 p40 K.O., déficientes en IL-12 et IL-23, développent une candidose oro-pharyngée chronique, mais pas de candidose systémique, tandis que les souris TNF K.O. développent la candidose oro-pharyngée et systémique (Farah et al. 2006, He et al. 2010). Il existe plusieurs autres souris K.O., mais celles-ci sont plutôt utilisées lors d'études sur la candidose systémique.

Les souris transgéniques peuvent aussi être utilisées pour analyser la réponse immunitaire contre *C. albicans*. La souris transgénique ϵ 26 exprime le gène humain CD3 ϵ et présente des défauts des cellules NK et des lymphocytes T (Balish et al. 2001). Cette souris

transgénique est extrêmement sensible à la candidose oro-pharyngée et à la candidose intra-gastrique et meurt quatre semaines suite à l'infection au *C. albicans* (Balish et al. 2001). La durée maximale limitée d'une expérience sur ce modèle le rend peu propice à l'étude de la candidose chronique.

L'étude de la candidose oro-pharyngée dans le cadre de l'infection au VIH-1 nécessite l'utilisation de modèles pouvant reproduire les caractéristiques du SIDA chez l'homme. Les premiers modèles de ce type exprimaient le génome du VIH-1 dans des tissus spécifiques et développaient des lésions localisées comparables à celles observées chez les patients séropositifs, tel que la cataracte, l'hyperplasie de l'épiderme ou la néphropathie (Dickie et al. 1991, Dickie et al. 1993, Klotman et al. 1995, Dickie 1996, Klotman and Notkins 1996). Cependant, ces modèles ne présentent pas l'ensemble des caractéristiques du SIDA et ne sont donc pas complètement représentatifs (Hanna et al. 1998).

La souris transgénique C3H CD4C/HIV, mise au point au laboratoire du Dr. Paul Jolicoeur à l'Institut de recherches cliniques de Montréal (IRCM), reproduit fidèlement les atteintes causées par le SIDA chez l'homme (Hanna et al. 1998). En présence du promoteur de la molécule CD4 humaine et de l'*enhancer* de la molécule CD4 murine, le génome du VIH-1 est exprimé chez les populations cellulaires ciblées par le virus chez l'humain : les lymphocytes T CD4⁺ matures, les lymphocytes T immatures du thymus, les cellules dendritiques et les macrophages (Hanna et al. 1998). Il existe plusieurs constructions de souris C3H CD4C/HIV (Fig.10). Pour chacune de ces constructions, les gènes du VIH-1 sont soit fonctionnels, soit inactivés par mutation (Hanna et al. 1998). L'expression de *nef* est nécessaire et suffisante afin de produire une maladie similaire au SIDA : perte graduelle des lymphocytes T CD4⁺ et des cellules dendritiques matures; accumulation de cellules dendritiques immatures; augmentation du taux d'apoptose chez les lymphocytes T, surexpression de Fas et FasL, atrophie des organes lymphoïdes; amaigrissement; atteinte cardiaque; néphrite tubulo-interstitielle; pneumonie interstitielle (Hanna et al. 1998, Priceputu et al. 2005). À l'instar du SIDA chez l'humain, la sévérité de la maladie chez les souris transgéniques est liée au niveau d'expression du génome viral. Lorsque le génome est fortement exprimé, la maladie apparaît plus rapidement et est plus sévère (Hanna et al. 1998). L'humain est colonisé par *C. albicans* tôt après la naissance et est plus tard exposé au VIH-1. Par contre, la souris transgénique C3H

CD4C/HIV exprime le génome du VIH-1 avant d'être exposée au champignon. Cette limitation est bien reconnue et est inhérente à tous les modèles murins de candidose (de Repentigny 2004). Par ailleurs, les mesures expérimentales sont effectuées aux jours 7 ou 70 après l'infection au *C. albicans*, ce qui est plus représentatif de l'état de l'infection chez l'humain, plutôt qu'au stade de la primo-infection (jours 1-3).

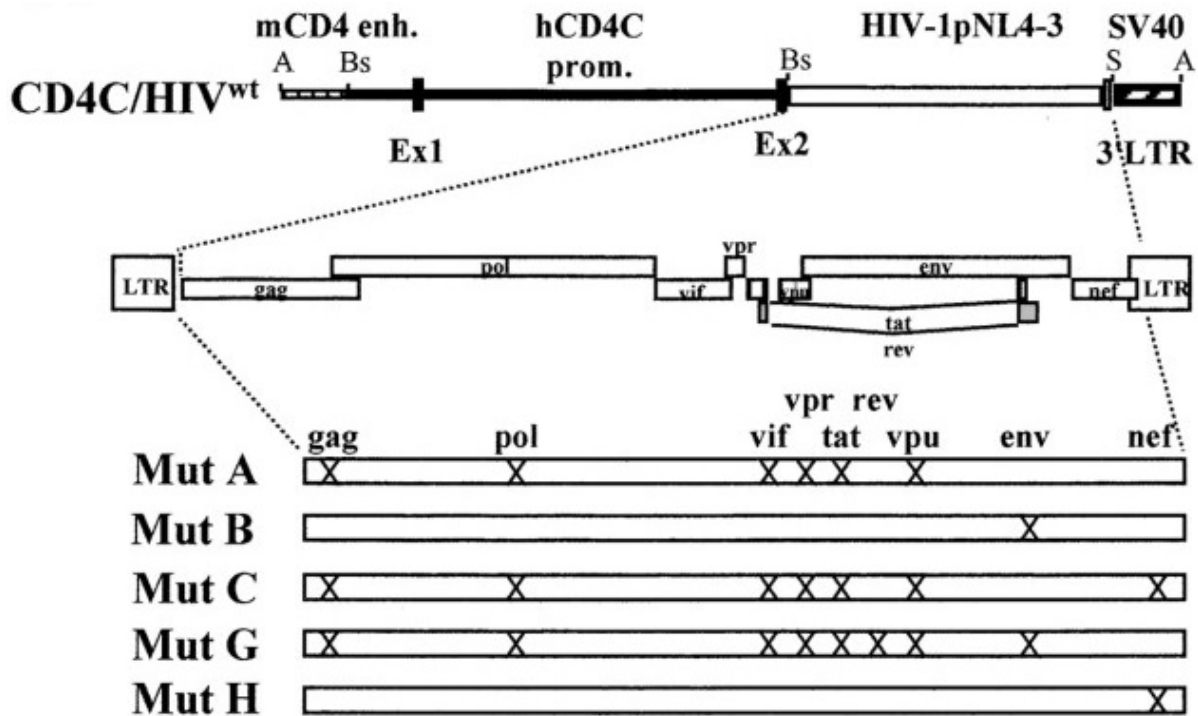


Figure 10. Construction du transgène CD4C/HIV. « X » représente le ou les gènes inactivés pour chacune des constructions. Image obtenue et modifié de (Hanna et al. 1998).

Suite à l'inoculation orale au *C. albicans*, la souris transgénique C3H CD4C/HIV^{MutA}, qui exprime *nef*, *env* et *rev*, présente un phénotype de susceptibilité à la candidose et, pour une durée de plusieurs mois, un phénotype de candidose chronique dont les aspects cliniques et pathologiques reproduisent fidèlement ceux observés chez les patients séropositifs : augmentation de la charge fongique en fonction de la progression de la maladie; pénétration des hyphes de *C. albicans* dans l'épithélium pavimenteux stratifié de la cavité buccale, limitée à la couche superficielle de l'épithélium; faible incidence de dissémination systémique du champignon; infiltration de cellules mononucléées dans la muqueuse buccale. (Hanna et al. 1998, de Repentigny et al. 2002, de Repentigny et al. 2004, Lewandowski et al. 2006).

Il convient de faire preuve de prudence lors de l'utilisation de modèles murins, puisque les effets des lymphocytes Th17 sur la candidose peuvent varier en fonction du modèle employé (Pirofski and Casadevall 2009). *C. albicans* n'est pas une espèce commensale chez la souris, ce qui signifie que la réponse immunitaire représentée tôt dans l'infection est probablement de type aïgue, puisqu'il s'agit du premier contact de la souris avec ce pathogène (Pirofski and Casadevall 2009). Par ailleurs, l'inoculation des souris est effectuée à l'aide de fortes concentrations de conidies du champignon (Lewandowski et al. 2006, Marquis et al. 2006, Goupil et al. 2009, Pirofski and Casadevall 2009). Afin d'obtenir des observations se rapprochant le plus des conditions chez l'humain, il convient d'étudier la réponse immunitaire après la phase aïgue de l'infection, alors que les conidies de *C. albicans* ont produit des hyphes.

Hypothèse

L'utilisation du modèle de candidose oro-pharyngée chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutA} exprimant le génome du VIH-1 chez les lymphocytes T CD4⁺, les cellules dendritiques et les macrophages, a permis de démontrer que l'altération des lymphocytes T CD4⁺ cause la sensibilité à candidose chronique chez ces souris (Lewandowski et al. 2006, Hanna et al. 2009). De plus, ce modèle a permis de démontrer que les cellules dendritiques chez les souris transgéniques présentent un phénotype immature et une perturbation de la présentation antigénique (Poudrier et al. 2003, Lewandowski et al. 2006). Par ailleurs, les lymphocytes T CD8⁺ sont impliqués lors de la défense de l'hôte contre la candidose chez la souris transgénique, mais ces cellules n'expriment pas le transgène VIH-1 (Marquis et al. 2006). La réponse des macrophages au *C. albicans* est largement préservée chez les souris transgéniques CD4C/HIV^{MutA} et n'affecte pas de façon majeure la sensibilité à la candidose (Goupil et al. 2009).

Puisque l'altération des lymphocytes T CD4⁺ est la cause principale de la sensibilité à la candidose oro-pharyngée chronique chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutA} exprimant les gènes *nef*, *env* et *rev* du VIH-1, et que les lymphocytes Th17 et les lymphocytes T régulateurs, deux sous-populations de lymphocytes T CD4⁺, sont impliqués dans la résolution de l'infection au *C. albicans*, **il est probable que les souris CD4C/HIV^{MutA} présentent une ou plusieurs altérations quantitatives ou fonctionnelles des lymphocytes Th17 ou des lymphocytes T régulateurs empêchant le contrôle et la résolution de la candidose oro-pharyngée.**

Afin d'étudier cette hypothèse, il convient de déterminer si :

Les lymphocytes Th17 et Tregs sont quantitativement altérés dans les ganglions cervicaux des souris transgéniques.

Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs provenant des souris CD4C/HIV^{MutA} conservent la capacité de se différencier en sous-populations Th1, Th2, Th17 et Treg.

L'expression du transgène altère la production de cytokines des lymphocytes différenciés *in vitro*.

Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs reçoivent une signalisation adéquate *in vivo* permettant leur différenciation.

L'injection des cytokines Il-17 et Il-22, seules ou en combinaison, restaure le phénotype protecteur chez la souris CD4C/HIV^{MutA}.

Chapitre 5 – Matériel et méthodes

Souris transgénique CD4C/HIV^{MutA}

Les souris transgéniques CD4C/HIV^{MutA} (Tg), issues de la souris fondatrice F21388, expriment modérément les produits fonctionnels des gènes *nef*, *env* et *rev* du VIH-1 chez les lymphocytes T CD4⁺, les cellules dendritiques et les macrophages (Hanna et al. 1998). L'expression du transgène chez les souris Tg cause une maladie similaire au SIDA. Les souris Tg ainsi que les souris contrôles non-transgéniques (non-Tg) sont de lignée C3H et certifiées exemptes de pathogènes. Les souris sont hébergées dans les micro-isolateurs stériles situés à l'animalerie G-5 de l'Université de Montréal. L'environnement (température, humidité, cycle jour/nuit) du G5 est contrôlé. De l'eau et de la nourriture stériles sont fournis aux souris. Le maintien de la colonie est assuré par Francine Aumont et Mathieu Goupil du laboratoire du Dr. Louis de Repentigny. Les couples reproducteurs sont constitués de mâles transgéniques et de deux femelles C3H non-Tg provenant des Laboratoires Harlan (www.harlan.com). La présence du transgène chez la progéniture est détectée par PCR (REDEExtract-N-Amp Tissue PCR kit, Sigma-Aldrich) sur l'ADN extrait de prélèvements de queues de souris. Les souris Tg et non-Tg des deux sexes et âgées de 42 à 56 jours (souris jeunes) ou de 70 à 84 jours (souris vieilles) sont utilisées lors des expériences. Des salles distinctes sont réservées à l'expérimentation et à la reproduction. Les expériences sur les animaux sont approuvées par le Comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux (CDEA) de l'Université de Montréal.

Modèle de candidose oro-pharyngée chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutA}

Candida albicans LAM-1 fut isolée du sang d'un patient atteint de candidose systémique, ce qui signifie que la souche provient probablement de la colonisation de la muqueuse buccale et du tractus gastro-intestinal (Lacasse et al. 1990). *C. albicans* LAM-1 fut sélectionnée pour sa virulence établie et caractérisée lors de travaux précédents utilisant le modèle de candidose oro-pharyngée (Lacasse et al. 1993, Deslauriers et al. 1997, Lewandowski et al. 2006, Marquis et al. 2006, Goupil et al. 2009, Hanna et al. 2009). La

souche est conservée au laboratoire du Dr. Louis de Repentigny à une température de -80°C. La souche est dégelée puisensemencée sur gélose Sabouraud-dextrose (cat. # 210950, BD Biosciences) durant 24 h à une température de 30°C. Des colonies sont ensuite prélevées et mises en culture, sous agitation constante, dans du bouillon Sabouraud (4 mL/tube) (cat. # CM0147, Oxoid) durant 18 h à une température de 30°C. Suite à deux lavages par centrifugation (800 x g, 9 minutes) à l'aide de PBS stérile (10 mM, pH 7,4), les culots sont resuspendus et combinés dans un seul tube de PBS stérile (10 mM, pH 7,4). Le décompte des conidies de *C. albicans* est déterminé à l'hématimètre. L'infection d'une souris au *C. albicans* nécessitant 1×10^8 conidies, le volume nécessaire est prélevé de la suspension cellulaire et transféré dans un tube Eppendorf. Le nombre de tubes Eppendorf varie en fonction du nombre de souris à inoculer. Les tubes Eppendorf sont centrifugés à 10 000 x g pendant 5 minutes et le surnageant en est retiré. Le culot, constitué de conidies de *C. albicans*, est conservé pour l'inoculation des souris.

Les souris Tg et non-Tg sont tout d'abord anesthésiées par l'injection intra-péritonéale de 100 µL d'une solution de kétamine/xylazine (1,5 mg de kétamine + 0,1 mg de xylazine par souris, voir annexe 1). L'anesthésie prévient la déglutition de l'inoculum de *C. albicans*, prolonge le temps de contact de l'inoculum avec la muqueuse buccale et limite l'inconfort de l'inoculation chez l'animal. La langue et la surface de la cavité buccale sont inoculées avec 1×10^8 conidies de *C. albicans* à l'aide d'un écouvillon d'alginate de calcium stérile (Calgiswab #25-800-A50, Puritan). Les souris infectées sont isolées jusqu'à l'euthanasie.

Analyse des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ par la cytométrie en flux

Afin d'analyser les proportions des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ chez les souris Tg et non-Tg, infectées ou non au *C. albicans*, les ganglions cervicaux sont prélevés chez des souris préalablement anesthésiées par l'injection de la solution de kétamine/xylazine (100 µL / 10 g). Pour réduire la contamination des ganglions par les cellules sanguines, une perfusion de PBS stérile (10 mM, pH 7,4) est effectuée à l'aide d'une aiguille 25G dans le ventricule gauche du cœur de la souris anesthésiée alors que l'oreillette droite est entaillée, ce qui permet au sang de s'écouler. La totalité des ganglions cervicaux sont prélevés et déposés

dans un Pétri contenant 1 mL de PBS stérile (10 mM, pH 7,4). Un filtre de nylon de 80 microns (Millipore) est déposé sur les ganglions, et ceux-ci sont broyés à l'aide du piston d'une seringue de 5 mL afin d'obtenir une suspension cellulaire (BD Biosciences). La suspension cellulaire est ensuite filtrée (80 microns, Millipore) et centrifugée (9 minutes, 800 x g). Le culot est resuspendu dans des tubes de cytométrie en flux (BD Falcon™) afin de marquer les cellules à l'aide d'anticorps.

Tableau II - Combinaisons d'anticorps utilisés pour l'analyse des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺

Lymphocytes T CD4 ⁺		Tregs	
Tube	Anticorps	Tube	Anticorps
1	Cellules seules	1	Cellules seules
2	CD4	2	CD4
3	CD4 + CCR6	3	CD4 + CD25
4	CD4 + CCR4	4	CD4 + Foxp3
5	CD4 + CXCR3	5	CD4 + isotypes
6	CD4 + isotypes	6	CD4 + CD25 + Foxp3
7	CD4 + CCR6 + CCR4 + CXCR3		

Chacun des tubes contenant des cellules provenant des ganglions cervicaux sont incubés durant 30 minutes à 4°C en présence des combinaisons d'anticorps décrites au tableau II et au tableau III. Pour les tubes utilisés dans l'analyse des Tregs, un marquage intracellulaire avec l'anticorps anti-Foxp3 est effectué conformément aux

Tableau III - Anticorps utilisés pour l'analyse des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺

Th1, Th2, Th1Th17, Th17:			
Anticorps	Fluorochrome	Source	No. de produit
CD4	FITC	Biologend	100406
CCR4	APC	Biologend	131212
CCR6	PE	Biologend	129804
CXCR3	PerCP Cy5.5	Biologend	126514
Treg:			
Anticorps	Fluorochrome	Source	No. de produit
CD4	PE	BD	553081
CD25	APC	BD	558643
Foxp3	FITC	eBioscience	11-5773-80

instructions incluses dans la trousse Cytofix/Cytoperm (Cat. # 554714, BD Biosciences). Les cellules marquées sont ensuite lavées deux fois par l'ajout de 1 mL de PBS stérile à chacun des tubes suivi d'une centrifugation (9 minutes, 800 x g). Après les lavages, les cellules sont resuspendues dans 250 µl de PBS stérile (10 mM, pH 7,4). L'analyse des échantillons et des

contrôles est effectuée sur 50 000 cellules CD4⁺ sur un appareil FACS Calibur (BD Biosciences) à l'aide du logiciel CellQuest.

Les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ sont identifiées par l'expression différentielle de marqueurs de surface. Les combinaisons proviennent originalement du laboratoire du Dre Petronela Ancuta, et ont été adaptés pour l'utilisation chez la souris (Acosta-Rodriguez et al. 2007, Gosselin et al. 2010, Koelink et al. 2012, Coursey et al. 2013, Moriguchi et al. 2013): Th1 : CD4⁺ CCR6⁺ CCR4⁻ CXCR3⁺; Th2 : CD4⁺ CCR6⁻ CCR4⁺ CXCR3⁻; Th17 : CD4⁺ CCR6⁺ CCR4⁺ CXCR3⁺; Th1Th17 : CD4⁺ CCR6⁺ CCR4⁻ CXCR3⁺; Treg : CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺.

Tri cellulaire de la population de lymphocytes T CD4⁺ naïfs

Tableau IV - Combinaisons d'anticorps utilisés pour le tri des lymphocytes T CD4⁺ naïfs

Tube	Anticorps
1	Cellules seules
2	CD4
3	CD4 + CD25
4	CD4 + CD44
5	CD4 + CD62L
6	CD4 + isotypes
7	CD4 + CD25 + CD44 + CD62L

Les souris Tg et non-Tg sont anesthésiées et perfusées tel que décrit précédemment. Les rates de souris Tg ou non-Tg sont prélevées puis broyées mécaniquement dans 5 mL de milieu ISCOVE (Wisent) supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin (Gibco). La suspension cellulaire obtenue lors du broyage est filtrée

à l'aide d'un filtre de nylon de 80 microns (Millipore), puis enrichie en cellules CD4⁺ en suivant le protocole de la trousse de sélection négative « Mouse CD4⁺ T-Cell Enrichment Kit » (Stemcell Technologies). Les cellules CD4⁺ purifiées sont ensuite marquées selon les combinaisons d'anticorps indiqués aux tableaux IV et V. Le tri cellulaire est effectué sur un appareil FACS Vantage SE à l'aide du logiciel CellQuest (BD Biosciences).

Tableau V - Anticorps utilisés pour le tri des lymphocytes T CD4⁺ naïfs

Anticorps	Fluorochrome	Source	No. de produit
CD4	PerCp-Cy5.5	BD	550954
CD25	PE-Cy7	BD	552880
CD44	PE	BD	553134
CD262L	APC	BD	553152

Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs sont sélectionnés grâce à la combinaison de marqueurs CD4⁺ CD25⁻ CD44^{lo} CD62L^{hi}.

Différenciation cellulaire de lymphocytes T CD4⁺ naïfs *in vitro*

Afin d'évaluer la capacité des lymphocytes T CD4⁺ naïfs à se différencier en sous-populations CD4⁺ spécifiques *in vitro*, 1 x 10⁵ lymphocytes T CD4 naïfs provenant du tri cellulaire de rates de souris Tg ou non-Tg sont mis en culture dans une plaque de 96-puits contenant 200 µL de milieu ISCOVE (Wisent) supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin (Gibco) ainsi que des cytokines (eBiosciences) et des anticorps (BD Biosciences) permettant la différenciation en sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ (tableau VI): 10 ng/mL Il-12, 10 ng/mL IFN-γ et anti-Il-4 (**Th1**); 10 ng/mL Il-4 et anti-IFN-γ (**Th2**); 5 ng/mL TGF-β, 20 ng/mL Il-6, 10 ng/mL Il-1β, 10 ng/mL Il-21, 10 ng/mL Il-23, anti-IFN-γ et anti-Il-4 (**Th17**); 5 ng/mL TGF-β et 10 ng/mL Il-2 (**Treg**). Les puits contrôles ne contiennent pas de cytokines. Tous les puits contiennent aussi des billes permettant la co-stimulation des molécules CD3 et CD28 (Dynabeads® Mouse T-Activator CD3/CD28, cat.# 11456D, Gibco, Life Technologies). Les plaques de 96-puits sont incubées durant 6 jours à une température de 37°C avec 5 % de CO₂. Les surnageants et les cellules sont conservés pour les étapes subséquentes.

Tableau VI - Cytokines et anticorps utilisés pour la différenciation des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺

Cytokines	Source	No. de produit	Anticorps	Source	No. de produit
Il-1β	eBiosciences	14-8012-62	Anti-IFN-g	BD	551309
Il-2	eBiosciences	14-8021-64	Anti-Il-4	BD	554434
Il-4	eBiosciences	14-8041-62			
Il-6	eBiosciences	14-8061-62			
Il-12	eBiosciences	14-8121-62			
Il-21	eBiosciences	14-8211-62			
Il-23	eBiosciences	14-8231-63			
IFN-γ	eBiosciences	14-8311-63			
TGF-β	eBiosciences	14-8348-62			

Afin d'analyser l'expression des gènes *Tbet*, *Ifng*, *Tnf*, *Gata3*, *Stat6*, *Il4*, *Il10*, *Foxp3*, *Tgfb*, *Ahr*, *Rora*, *Rorc*, *Il17a*, *Il17f*, *Il21* et *Il22* (Primerdesign, UK), l'ARN est extrait des lymphocytes T différenciés à l'aide du protocole fourni avec la trousse RNEasy Mini Kit de QIAGEN (cat. # 74104). Les analyses de PCR en temps réel (40 cycles) sont effectuées à l'aide de la trousse Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, cat. # 204076) sur un appareil Rotor-Gene 6000 (QIAGEN). Les gènes *Ubc*, *B2m* et *Atp5b* sont utilisés en tant que gènes de référence. L'analyse des données est effectuée avec le logiciel REST 2009 (QIAGEN).

La production des cytokines Il-2, Il-4, Il-6, Il-10, Il-21, IFN- γ , MIP-1 α , TGF- β et TNF- α par les lymphocytes T CD4⁺ différenciés est évaluée sur FACS Calibur équipé du logiciel CellQuest, à l'aide du protocole des trousse Cytometric Bead Array (CBA) Flex Set (BD Biosciences). Les trousse utilisées sont indiquées au tableau VII. Les données sont analysées avec le logiciel BD FCAP Array 3.0 (BD Biosciences).

Production de cytokines *in vivo* dans les ganglions cervicaux

Afin d'analyser la production des cytokines Il-1 β , Il-2, Il-4, Il-6, Il-10, Il-12p70, Il-17a, Il-21, IFN- γ , TGF- β et TNF- α *in vivo*, les ganglions cervicaux de souris Tg et non-Tg, infectées ou non au *C. albicans*, sont prélevés et broyés tel que mentionné précédemment. La suspension cellulaire obtenue par le broyage des ganglions cervicaux est centrifugée (9 minutes, 200 x g) et les surnageants sont conservés à une température de -80 °C jusqu'à l'analyse à l'aide des trousse CBA Flex (BD Biosciences). Les données sont analysées avec le logiciel BD FCAP Array 3.0 (BD Biosciences).

Tableau VII - Trousse de CBA utilisées pour l'analyse de la production de cytokines par les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺

CBA	Source	No. de produit
Il-1 β	BD	560232
Il-2	BD	558297
Il-4	BD	558298
Il-6	BD	558301
Il-10	BD	558300
Il-12p70	BD	558303
Il-13	BD	558349
Il-17a	BD	560283
Il-21	BD	560160
IFN- γ	BD	558296
MCP-1	BD	558342
MIP-1 α	BD	558449
TGF- β	BD	560429
TNF- α	BD	558299

Injection d'Il-17 et/ou d'Il-22

Dans le but de déterminer si le traitement avec les cytokines recombinantes Il-17 et/ou Il-22 restaure la protection contre la candidose oro-pharyngée chez les souris Tg infectées au *C. albicans*, des souris Tg et non-Tg sont inoculées oralement avec le champignon. Le jour suivant l'inoculation, et tous les deux jours subséquents pour une durée de 14 jours, les souris Tg infectées reçoivent une injection intra-péritonéale de 3 µg d'Il-17a (eBiosciences, cat. # 34-8171-82) et/ou d'Il-22 (eBiosciences, cat. # 34-8221-82) dans une solution de 200 µL de PBS stérile, alors que les souris Tg infectées témoins reçoivent 200 µL de PBS stérile uniquement. Les souris non-Tg infectées ne reçoivent ni cytokines, ni PBS stérile.

Afin de faire le suivi de la charge buccale fongique chez les souris infectées au *C. albicans*, le décompte des unités formatrices de colonies (CFUs) de la cavité buccale de ces souris est effectué quotidiennement. La méthode de prélèvement décrite ci-dessous est utilisée car elle permet l'obtention de mesures longitudinales sur les mêmes individus, différencie la charge fongique entre les souris Tg et non-Tg et réduit le nombre d'animaux nécessaires, en accord avec les directives du CDEA et du CCPA (Lewandowski et al. 2006, Marquis et al. 2006, Goupil et al. 2009, Hanna et al. 2009, Melkoumov et al. 2013). La souris est immobilisée, puis un écouvillon stérile (Calgiswab #25-800-A50, Puritan) est utilisé pour frotter la cavité buccale (joues, palais, langue) de l'animal durant 5 secondes. L'écouvillon est déposé dans un tube contenant 2 mL de solution Ringer (voir annexe 1). Les tubes contenant les écouvillons sont vortexés durant 5 secondes, puis 200 µL sont déposés et étalés sur gélose Sabouraud-dextrose (cat. # 210950, BD Biosciences). Les géloses sont incubées durant 24 h à une température de 30 °C. Le décompte des CFUs est calculé pour chacun des Pétris.

Les langues de souris Tg et non-Tg, infectées ou non au *C. albicans* et traitées ou non avec les cytokines Il-17 et Il-22 sont prélevées suite à l'anesthésie et à la perfusion des animaux. Les langues prélevées sont coupées longitudinalement en deux moitiés. La première moitié de langue est utilisée pour les colorations histologiques HPS (*hematoxylin phloxine saffron*) et Grocott (*Gomori-Grocott methenamine silver stain*) afin d'évaluer la réponse inflammatoire et l'étendue de l'infection au *Candida* (Luna 1992). L'analyse de l'histopathologie des langues de souris est confiée au Dr. Louis Gaboury, directeur du laboratoire d'histologie de l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie (IRIC).

La deuxième moitié de langue est utilisée pour l'analyse de l'expression des gènes *Ccl2*, *Ccl20*, *Defb3*, *Cxcl15*, *Il17*, *Il22* et *S100a8* au qRT-PCR à l'aide de la trousse Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (QIAGEN, cat. # 204076) sur un appareil Rotor-Gene 6000 (QIAGEN). Le gène *18S* ou les gènes *Gapdh* et *Ubc* sont utilisés comme gènes de référence. Les données obtenues par qPCR sont analysées par le logiciel REST 2009 (QIAGEN).

Analyses statistiques

Le logiciel IBM SPSS Statistics pour Windows v.20 (IBM, Armonk, NY) est utilisé pour l'analyse des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ ainsi que pour la production de cytokines de ces cellules *in vitro* et *in vivo*. L'analyse de l'expression des gènes au qRT-PCR est effectuée avec le logiciel REST 2009 (QIAGEN). Les charges fongiques de *C. albicans* des souris Tg et non-Tg sont comparées par l'analyse de variance avec la correction de Welch, suivi du test de Games-Howell pour les comparaisons multiples de variances inégales. Les différences sont considérées significatives lorsque $p < 0,05$. Le nombre de lymphocytes T CD4⁺ naïfs chez les souris Tg et non-Tg est comparé à l'aide d'un test de *t* non-apparié utilisant la correction de Welch. La différence est considérée significative lorsque $p < 0,05$.

Chapitre 6 – Résultats

Les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ sont déplétées chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutA}

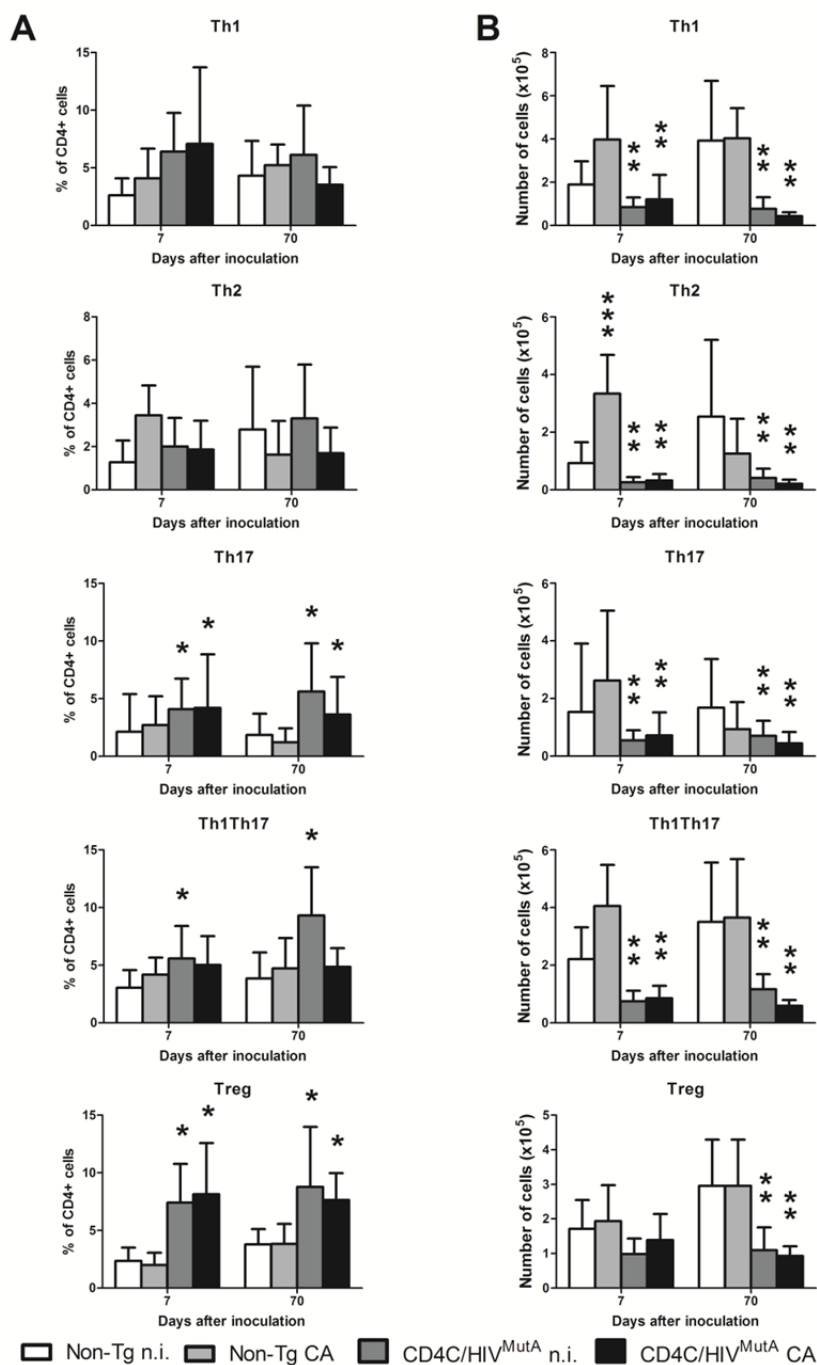


Figure 11. Sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ dans les ganglions cervicaux de souris CD4C/HIV^{MutA} et non-Tg, infectées ou non au *C. albicans*.

Les sous-populations sont représentées en pourcentages du compartiment CD4⁺ (A), et en valeurs absolues (B) de la moyenne ± SD de 4 à 13 expériences.

*, p<0,05 pourcentage plus élevé que les souris non-Tg.

**, p<0,03 nombre réduit comparativement aux souris non-infectées.

***, p<0,05 nombre plus élevé comparativement aux souris non-Tg n.i.

CA : infection au *C. albicans*

n.i. : souris non-infectées.

Le pourcentage ainsi que le nombre absolu des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ dans les ganglions cervicaux ont été compilés à la figure 11. À 7 et 70 jours, les ganglions cervicaux des souris Tg non-infectées ont été significativement enrichis des sous-populations de lymphocytes Th17, Th1Th17 et Treg alors que les ganglions cervicaux des souris Tg infectées au *C. albicans* ont été significativement enrichis des sous-populations de lymphocytes Th17 et Treg, indépendamment de la durée de l'infection. Toutes les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ furent sévèrement déplétées 70 jours après l'infection, mais les cellules Tregs n'ont pas été déplétées de façon significative 7 jours après l'infection. Le nombre de lymphocytes Th2 a été significativement augmenté chez les souris non-Tg infectées, mais pas chez les souris Tg infectées. Une tendance à la prolifération des sous-populations Th1, Th1Th17 et Th17 a été observée chez les souris non-Tg 7 jours après l'infection, mais la différence n'était pas significative (p=0,302). Les précurseurs de ces sous-populations, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs, ont été sévèrement déplétés chez les souris Tg (Fig.12).

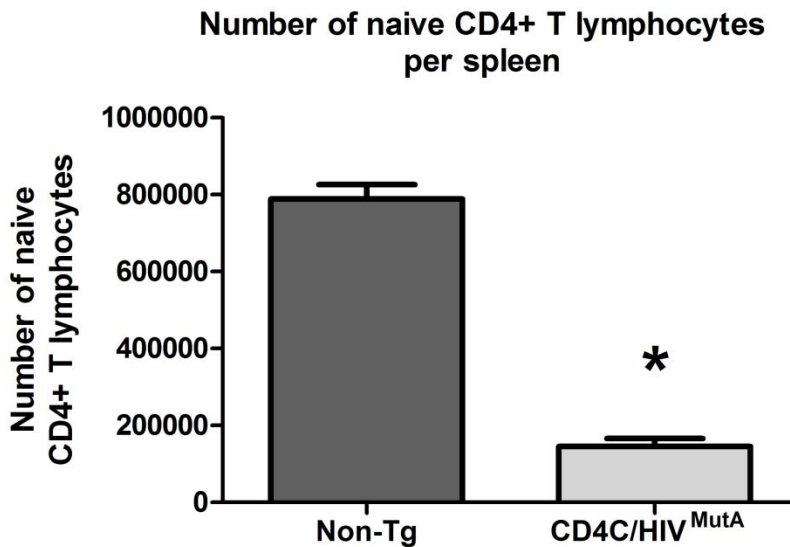


Figure 12. Nombre de lymphocytes T CD4⁺ naïfs extraits de rates de souris CD4C/HIV^{MutA} et non-Tg lors du tri cellulaire. *, p<0,0001 comparativement aux souris non-Tg. Les données représentent la moyenne ± SD de onze expériences.

L'expression des gènes polarisant la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ est altérée chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutA}

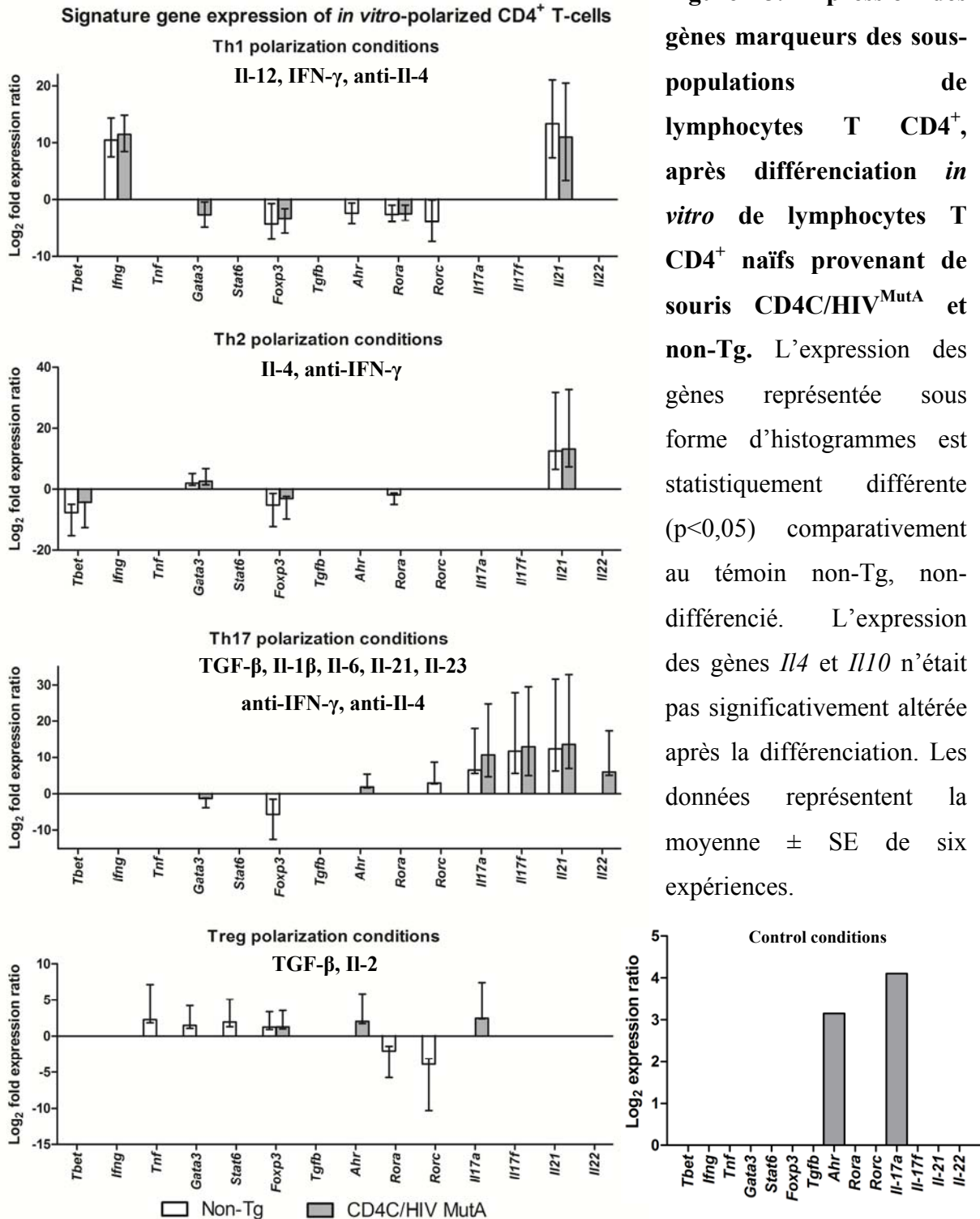


Figure 13. Expression des gènes marqueurs des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺, après différenciation *in vitro* de lymphocytes T CD4⁺ naïfs provenant de souris CD4C/HIV^{MutA} et non-Tg. L'expression des gènes représentée sous forme d'histogrammes est statistiquement différente ($p < 0,05$) comparativement au témoin non-Tg, non-différencié. L'expression des gènes *Il4* et *Il10* n'était pas significativement altérée après la différenciation. Les données représentent la moyenne \pm SE de six expériences.

Afin de vérifier si l'expression du transgène VIH-1 chez les lymphocytes T CD4⁺ naïfs des souris Tg affecte leur différenciation cellulaire, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs de souris Tg et non-Tg ont été mis en culture *in vitro* dans des milieux contenant des cytokines polarisant leur différenciation en sous-populations Th1, Th2, Th17 et Treg. La figure 13 représente l'expression des gènes des facteurs de transcription et des cytokines associés à chacune de ces sous-populations différenciées, comparativement au témoin non-Tg. Comparativement aux lymphocytes témoins non-différenciés, les cellules différenciées Th1, Th2, Th17 et Treg provenant des souris Tg et non-Tg ont exprimé tel que prévu les facteurs de transcription associés au phénotype, tout en ayant réduit l'expression des facteurs de transcription associés aux autres phénotypes (voir tableau I). Les gènes des cytokines ont aussi été exprimés en fonction du phénotype (voir tableau I). Toutefois, les lymphocytes T CD4⁺ différenciés en cellules Th1 ont exprimé le gène *Il21*, une cytokine normalement associée aux phénotypes Th2 et Th17 et qui inhibe la production d'IFN- γ chez les cellules Th1 (Wurster et al. 2002, Suto et al. 2006, Wei et al. 2007, Korn et al. 2009).

L'expression du transgène VIH-1 n'altère pas la production de cytokines chez les lymphocytes

T CD4⁺ différenciés *in vitro*

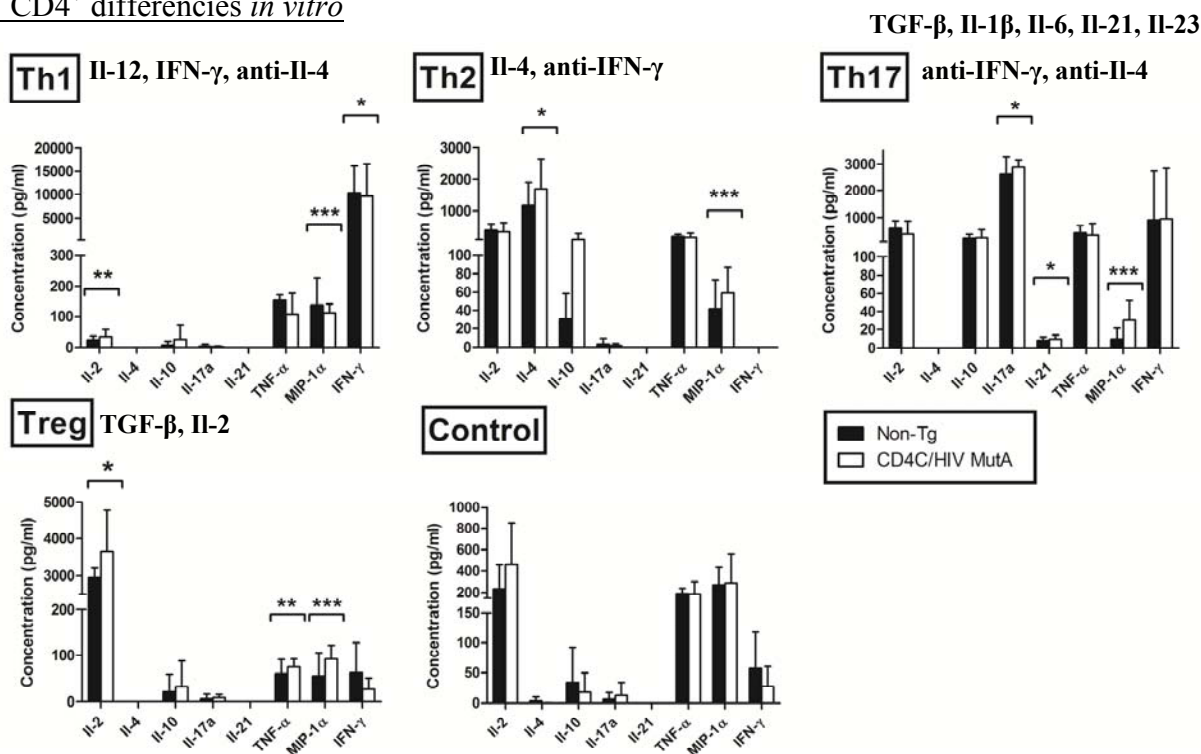


Figure 14. Production de cytokines par les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ différenciés *in vitro*. *, production significativement plus élevée ($p < 0,05$) comparativement aux autres sous-populations et au témoin non-différencié. **, production significativement plus faible comparativement aux autres sous-populations et au témoin non-différencié. ***, production significativement plus réduite que le témoin non-différencié. La production des cytokines IL-1 β et IL-6 n'a pas été détectée dans aucune des conditions de culture. Les données représentent la moyenne \pm SD de six expériences.

Afin de déterminer si l'expression du transgène affecte la sécrétion des cytokines chez les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺, la présence de cytokines est analysée dans le surnageant de culture des cellules différenciées (Fig.14). Chacune des populations cellulaires a produit les cytokines typiquement associées au phénotype induit lors de la différenciation (tableau I), indépendamment de l'expression ou non du transgène. Ainsi, la production d'IFN- γ (Th1), IL-4 (Th2), IL-17 (Th17) et IL-2 (Treg) a été significativement ($p < 0,05$) plus élevée

chez les cellules du phénotype approprié. Le transgène n'affecte donc pas la production de cytokines chez les lymphocytes T CD4⁺ différenciés *in vitro*.

Altération de la production de cytokines dans les ganglions cervicaux chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutA}

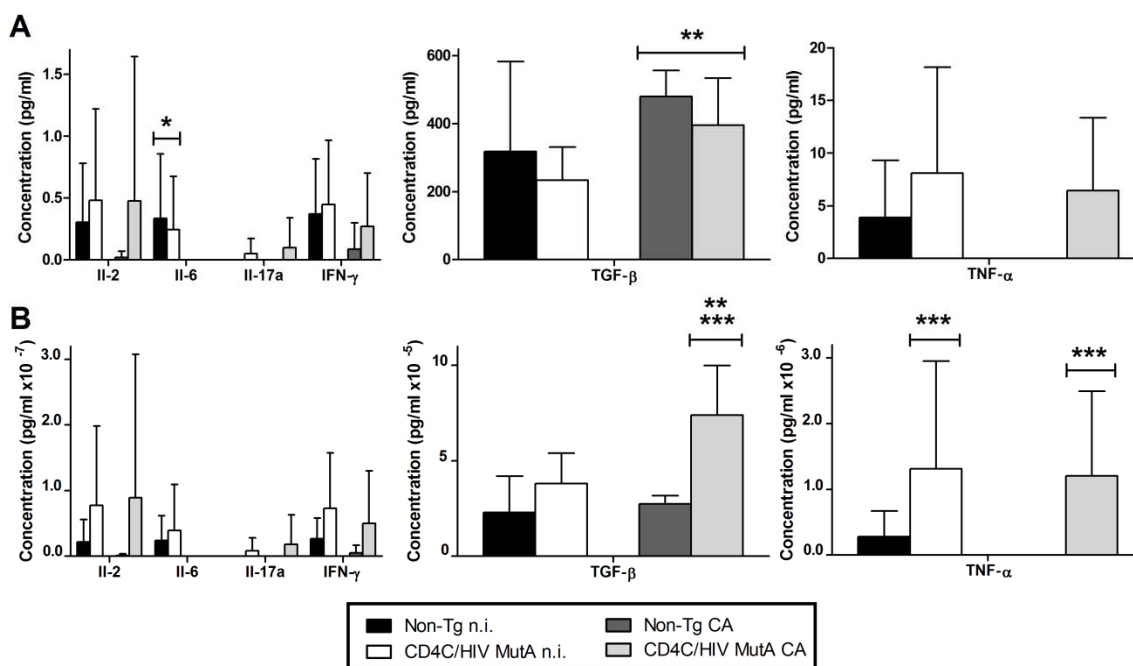


Figure 15. Production de cytokines dans les ganglions cervicaux de souris CD4C/HIV^{MutA} et non-Tg, 7 jours après infection ou non au *C. albicans*. Les données indiquent la production totale de cytokines du ganglion (A), ou la production de cytokines en fonction de la cellularité du ganglion (B). *, concentration plus élevée ($p < 0,05$) comparativement aux souris infectées au *C. albicans*. **, concentration plus élevée ($p < 0,05$) comparativement aux souris non-infectées. ***, concentration par cellule plus élevée ($p < 0,05$) comparativement aux souris non-Tg infectées au *C. albicans*. La production des cytokines IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-17a, IL-21 et IFN- γ se situe sous le seuil de détection théorique du CBA (5 pg / mL). Les données représentent la moyenne \pm SD de six expériences.

Afin de déterminer si l'expression du transgène altère la production des cytokines requises pour la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs, et des cytokines produites par les cellules différenciées *in vivo*, les ganglions cervicaux sont prélevés et broyés sept jours

après l'infection ou non au *C. albicans*. La présence des cytokines est déterminée dans le surnageant du broyat des ganglions cervicaux (Fig.15). La production d'Il-6 fut détectée dans les ganglions cervicaux des souris Tg et non-Tg non-infectées ($p < 0,05$), tandis que la production de TGF- β fut significativement augmentée ($p < 0,05$) dans les ganglions cervicaux prélevés chez les souris Tg et non-Tg infectées (Fig.15 A). De plus, une faible concentration d'Il-17 a été retrouvée dans les ganglions cervicaux des souris Tg (Fig.15 A).

Puisque l'hypocellularité des ganglions chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutA} est déjà connue (Lewandowski et al. 2006), il est pertinent de présenter la production des cytokines en fonction du nombre de cellules présentes dans le ganglion (Fig.15 B). Ainsi, l'expression du transgène chez les cellules provenant des ganglions cervicaux de souris Tg a augmenté la production de TNF- α comparativement aux cellules extraites des ganglions cervicaux de souris non-Tg. De plus, la production de TGF- β fut augmentée chez les cellules provenant des ganglions cervicaux de souris Tg infectées au *C. albicans* comparativement aux cellules des souris Tg non-infectées et des souris non-Tg.

Augmentation de la résistance à la candidose oro-pharyngée suite au traitement de souris transgéniques CD4C/HIV^{MutA} infectées au *C. albicans* avec les cytokines Il-17 et Il-22

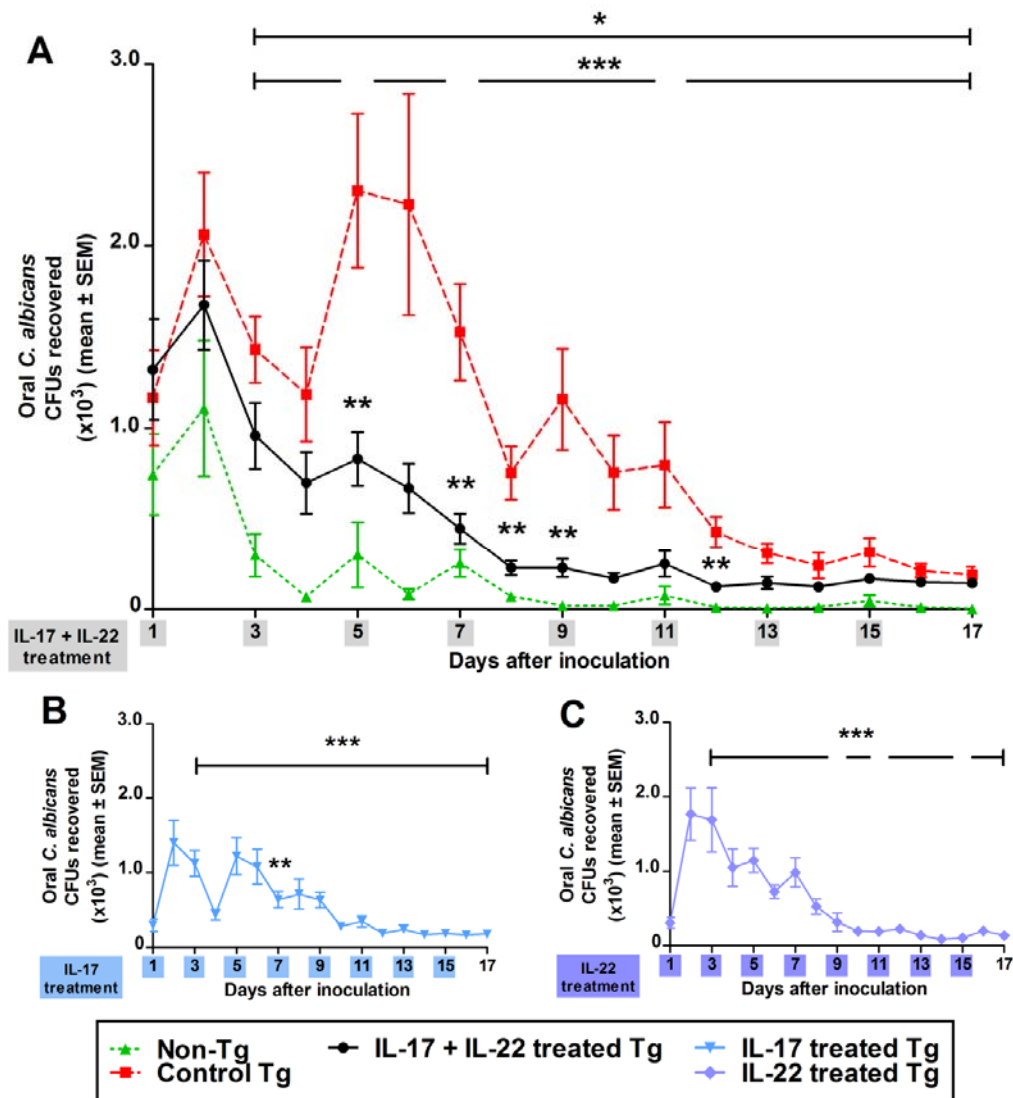


Figure 16. Charge fongique buccale chez les souris CD4C/HIV^{MutA} et non-Tg infectées au *C. albicans*. Les souris sont traitées avec la combinaison des cytokines Il-17 et Il-22 (A), Il-17 seul (B) ou Il-22 seul (C). Les traitements avec les cytokines individuelles (B et C) sont affichés dans des panneaux distincts afin de clarifier la figure. Les contrôles sont les mêmes qu'en A. *, p<0,05 chez les souris Tg témoins comparativement aux souris non-Tg. **, p<0,05 chez les souris Tg traitées comparativement aux souris Tg témoins. ***, p<0,05 chez les souris Tg traitées comparativement aux souris non-Tg. L'expérience a été répétée 3 fois et les données représentent la moyenne ± SD de 10 à 22 souris.

Bien que la figure 11 indique que les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ sont déplétées, il a été démontré que la sous-population Th17, ainsi que les cytokines Il-17 et Il-22 produites par celle-ci, jouent un plus grand rôle dans la défense contre la candidose oro-pharyngée que les autres sous-populations (Romani et al. 2008, Conti et al. 2009, Zhou et al. 2009, Hernandez-Santos and Gaffen 2012, Hernandez-Santos et al. 2013). Une attention particulière a donc été accordée aux lymphocytes Th17. En effet, la réduction du nombre de Th17, ou de leurs cytokines, pourrait être l'une des causes de la susceptibilité à la candidose chez la souris transgénique. Ainsi, dans le but de déterminer si le traitement aux cytokines restaure la protection contre la candidose *in vivo*, des souris Tg CD4C/HIV^{MutA} et des souris non-Tg ont été inoculées au *C. albicans*. Les charges fongiques des divers groupes expérimentaux sont représentées à la figure 16. Tel que démontré précédemment par le groupe du Dr. Louis de Repentigny (de Repentigny et al. 2002), les souris Tg infectées mais non-traitées ont une charge fongique significativement ($p < 0,05$) plus élevée que les souris non-Tg infectées (Fig.16 A). Bien que la charge fongique chez les souris Tg traitées à l'aide de la combinaison des cytokines Il-17 et Il-22 fut généralement plus élevée ($p < 0,05$, sauf jours 5, 7 et 11) que chez les souris non-Tg infectées, cette même charge fongique est demeurée tout de même plus faible que chez les souris Tg infectées non-traitées, aux jours 5, 7, 8, 9 et 12 (Fig.16 A). Les jours 6, 10 et 11 ont affiché une tendance ($p = 0,123$, $p = 0,066$, $p = 0,198$, respectivement) à l'abaissement de la charge fongique comparativement aux souris Tg témoins. Le traitement à l'aide de la combinaison des cytokines Il-17 et Il-22 restaure donc partiellement la résistance à la candidose oro-pharyngée.

Par contre, la charge fongique des souris Tg traitées à l'aide de la cytokine Il-17 seule n'a pas été différente de la charge fongique des souris Tg non-traitées, sauf au jour 7 (Fig.16 B). De plus, la charge fongique de ces souris fut significativement ($p < 0,05$) plus élevée que la charge fongique des souris non-Tg (Fig.16 B). De plus, la charge fongique des souris Tg traitées à l'aide de la cytokine Il-22 seule ne fut pas différente de la charge fongique des souris Tg non-traitées et fut plus élevée que chez les souris non-Tg, sauf aux jours 9, 11 et 15 (Fig.16 C). Le traitement à l'aide des cytokines individuelles ne restaure donc pas la protection contre la candidose oro-pharyngée.

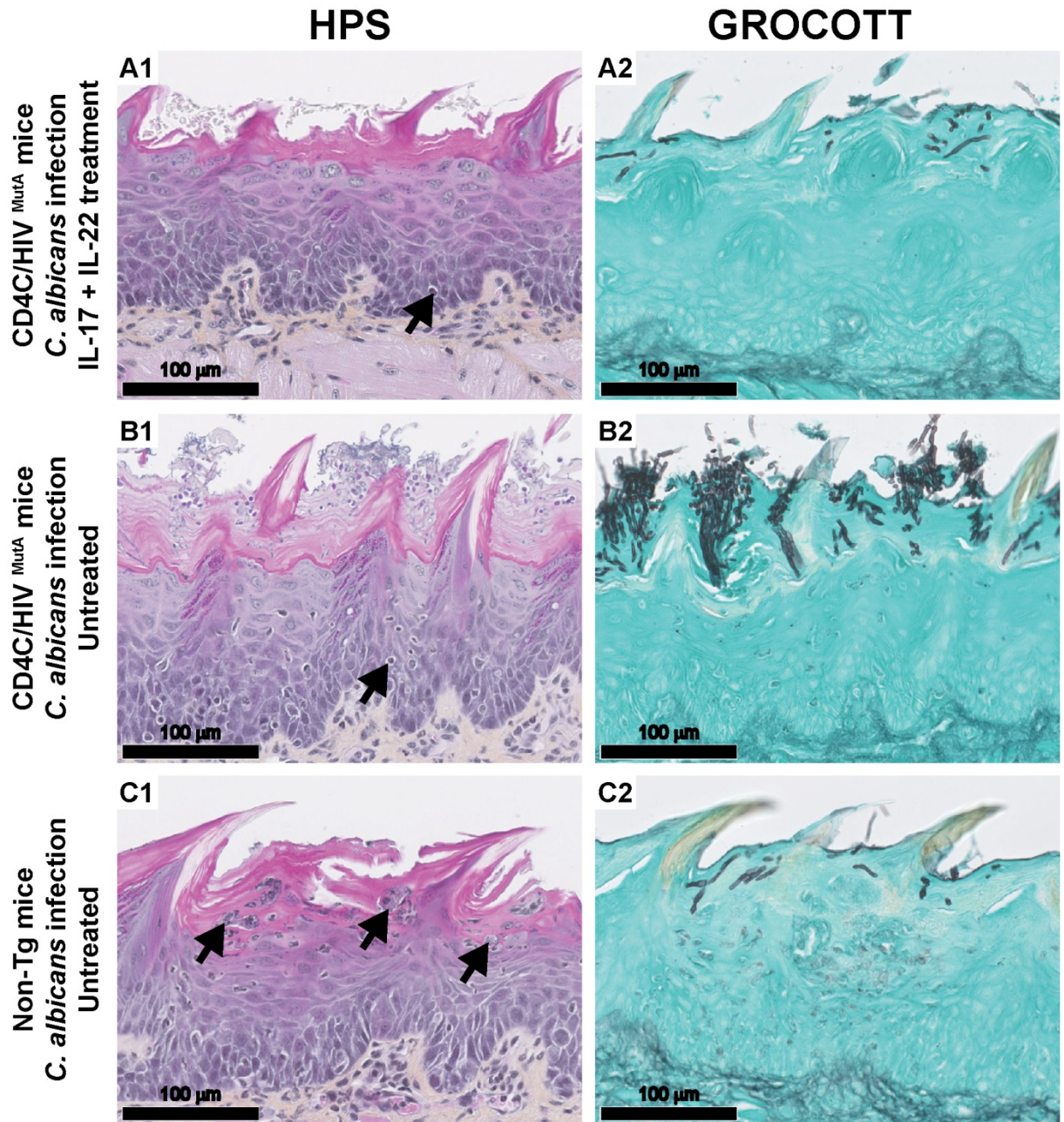


Figure 17. Coupes histologiques de langues de souris CD4C/HIV^{MutA} et non-Tg, 7 jours après l'infection au *C. albicans* et traitées ou non avec les cytokines Il-17 et Il-22. Les flèches indiquent les PMNs. Les images sont représentatives de 60 coupes histologiques obtenues chez six souris par condition expérimentale.

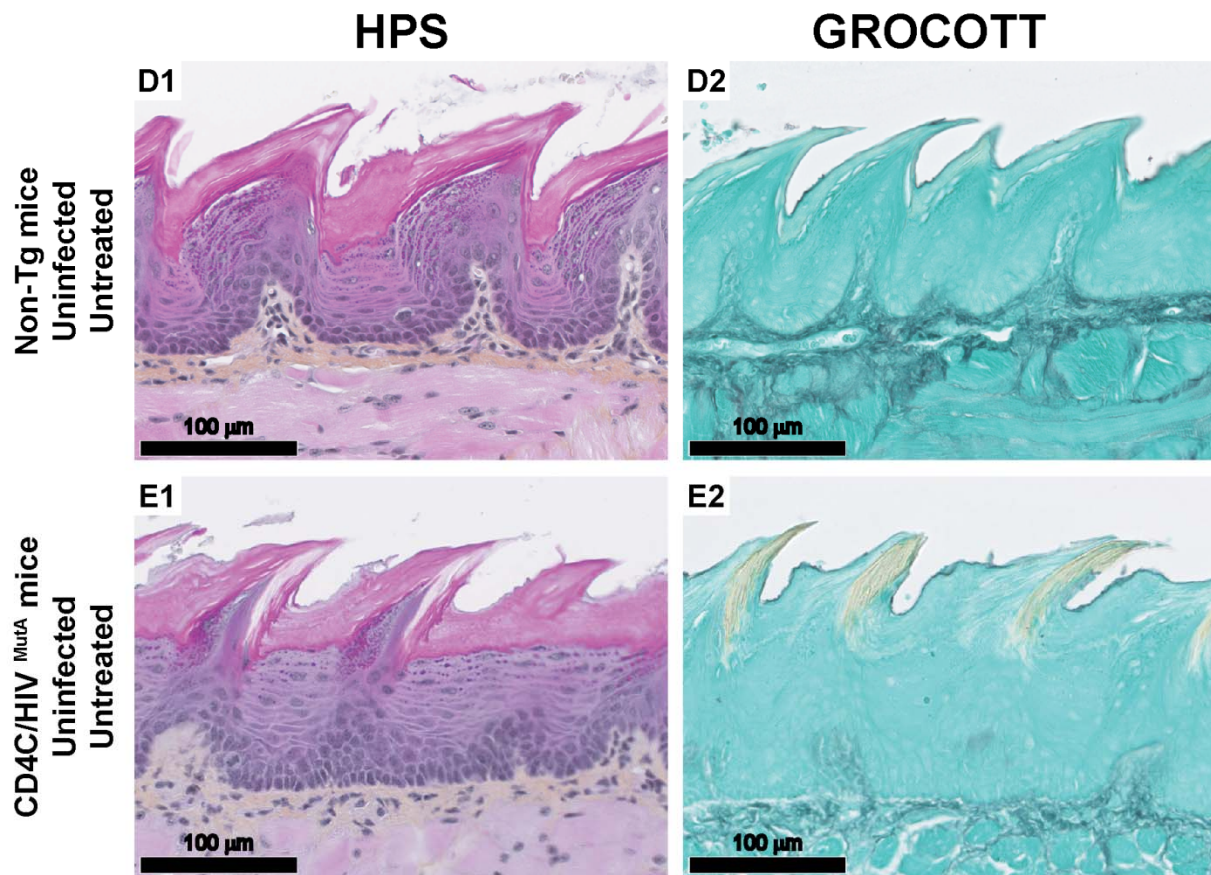


Figure 18. Coupes histologiques de langues de souris témoins CD4C/HIV^{MutA} et non-Tg, non-infectées. Les images sont représentatives de 60 coupes histologiques obtenues chez six souris par condition expérimentale.

Les coupes histologiques présentées aux figures 17 et 18 concordent avec les résultats présentés à la figure 16. Sept jours après l'infection au *C. albicans*, les souris Tg non-traitées ont présenté une faible infiltration cellulaire (réponse inflammatoire) localisée près de la membrane basale ainsi que de nombreux foyers d'infection composés d'hyphes pénétrant la couche kératinisée de l'épithélium sur toute la surface dorsale de la langue (Fig.17 B1, B2). Les souris Tg et non-Tg, non-infectées, n'ont présenté aucun foyer d'infection ni de réponse inflammatoire (Fig.18 D1, D2 et E1, E2). Ces observations sont des caractéristiques bien établies du modèle (de Repentigny et al. 2002). Par contre, la langue des souris Tg traitées à l'aide de l'Il-17 et Il-22 a présenté peu de foyers d'infection contenant très peu d'hyphes,

localisés à quelques endroits à la surface de l'épithélium, ainsi qu'une faible infiltration cellulaire localisée près de la membrane basale (Fig.17 A1, A2). À l'instar des souris Tg traitées, les souris non-Tg ont présenté une faible densité d'hyphes dans la couche kératinisée de l'épithélium à la surface de la langue (Fig.17 C2). Cependant, l'infiltration de cellules inflammatoires est détectée au niveau de la couche kératinisée de l'épithélium à chacun des foyers d'infection (Fig.17 C1). Le traitement des souris Tg infectées au *C. albicans* à l'aide de la combinaison de cytokines Il-17 et Il-22 réduit donc fortement la densité des hyphes de *C. albicans* à la surface dorsale de la langue, sans toutefois induire un recrutement additionnel de PMNs ou d'autres cellules inflammatoires vers l'épithélium.

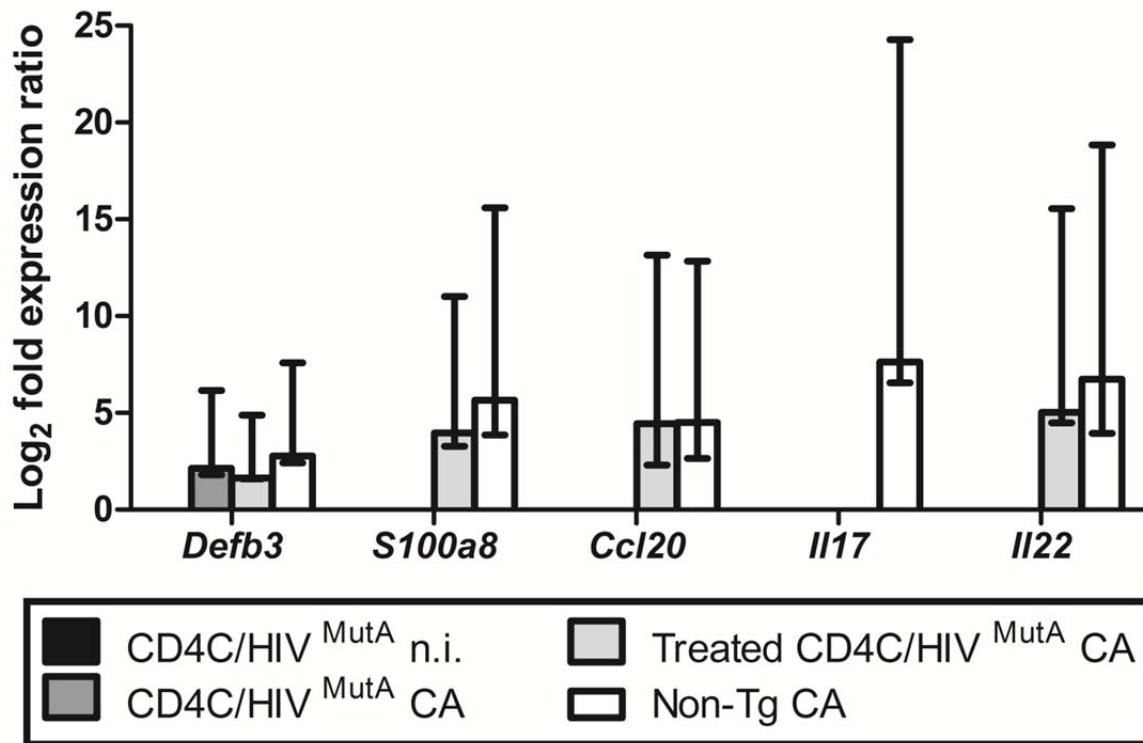


Figure 19. Analyse au qRT-PCR de l'expression des gènes *S100a8*, *Ccl20*, *Il22*, *Il17* et *Defb3* dans les langues de souris CD4C/HIV^{MutA} et non-Tg, 7 jours après l'infection ou non au *C. albicans*. L'expression des gènes *S100a8*, *Ccl20*, *Il22*, *Il17* et *Defb3* est significativement plus élevée chez les groupes de souris indiqués, comparativement aux souris non-Tg, non-infectées ($p < 0,05$). L'expression des gènes *Ccl2* et *Cxcl15* est détectable, mais elle n'est pas significativement différente. L'expérience a été répétée 6 fois et les données représentent la moyenne \pm SE de 6 souris par condition.

Puisque le traitement à l'aide des cytokines Il-17 et Il-22 ne restaure pas le recrutement de cellules inflammatoires vers l'épithélium, l'ARN des langues de souris fut extrait sept jours après l'infection ou non au *C. albicans* afin de déterminer si l'effet protecteur du traitement est associé aux gènes dont l'expression est augmentée par Il-17 et/ou Il-22. Comparativement aux souris non-Tg non-infectées, l'expression des gènes *Defb3*, *S100a8*, *Ccl20*, *Il22* et *Il17* dans les tissus de la langue fut significativement ($p < 0,05$) augmentée chez la souris non-Tg, 7 jours

après l'infection au *C. albicans* (Fig.19). Toutefois, chez les souris Tg infectées non-traitées, seule l'expression du gène *Def3* fut légèrement augmentée, alors qu'il n'y a aucune augmentation de l'expression de *S100a8*, *Ccl20*, *Il22* et *Il17*, démontrant que l'expression du transgène VIH-1 abolit complètement la capacité d'induire l'expression de ces quatre gènes en réponse à l'infection au *C. albicans*. Néanmoins, le traitement à l'aide d'Il-17 et d'Il-22 a restauré en partie l'expression des gènes *S100a8*, *Ccl20* et *Il22* chez les souris Tg (Fig.19). Il n'y a pas de différence significative entre le niveau d'expression de *Ccl20* ($p=0,914$) et *Defb3* ($p=0,140$) chez les souris Tg infectées traitées et les souris non-Tg infectées. Par contre, les gènes *S100a8* et *Il22* ont démontré une tendance à la réduction du niveau d'expression (*S100a8*, $p=0,089$; *Il22*, $p=0,056$) chez la souris Tg infectée traitée, comparativement aux souris non-Tg infectées (Fig.19). Ces résultats concordent avec la baisse de la charge fongique associée au traitement des souris Tg à l'aide des cytokines Il-17 et Il-22 (Fig.16). Il n'y a eu aucune différence significative de l'expression des gènes *S100a8*, *Ccl20*, *Il22*, *Il17* et *Defb3* entre les souris Tg non-infectées et les souris non-Tg non-infectées. Au jour sept chez les groupes étudiés, l'expression du transgène VIH-1, l'infection au *Candida* et le traitement aux cytokines n'ont pas altéré l'expression du gène *Ccl2* et du gène *Cxcl15*, codant pour CXCL15, une chimiokine produite par les cellules épithéliales du tractus gastro-intestinal et des poumons et pouvant recruter les PMNs au site d'infection à l'instar de l'Il-8 (CXCL8) chez l'humain (Rossi et al. 1999, Schmitz et al. 2007). Ces résultats indiquent que le traitement des souris Tg infectées au *C. albicans* à l'aide des cytokines Il-17 et Il-22 restaure, en totalité (*Defb3*, *Ccl20*) ou en partie (*S100a8*, *Il22*), la capacité des souris Tg à augmenter l'expression de ces gènes dans les tissus de la langue au jour sept de la candidose oro-pharyngée.

Chapitre 7 – Discussion

La souris transgénique CD4C/HIV^{MutA} présente une maladie similaire au SIDA chez l'humain. L'une des principales caractéristiques de cette maladie et du SIDA est la déplétion sévère des lymphocytes T CD4⁺. Par contre, l'effet du VIH-1 sur les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ n'est pas encore complètement élucidé. La découverte du rôle de la sous-population de lymphocytes Th17 lors de la résolution de la candidose oro-pharyngée et de la déplétion de cette sous-population chez les patients atteints du VIH-1 suggère qu'une perturbation de la réponse Th17 cause la susceptibilité à la candidose dans le contexte de l'infection au VIH-1 (Brenchley et al. 2008, Pirofski and Casadevall 2009, El Hed et al. 2010, Elhed and Unutmaz 2010, Gosselin et al. 2010, Prendergast et al. 2010, Glocker and Grimbacher 2011, Cassone and Cauda 2012, McGeachy and McSorley 2012, Bixler and Mattapallil 2013, Kim et al. 2013). L'utilisation du modèle de candidose oro-pharyngée chez la souris transgénique exprimant le génome du VIH-1 permet de démontrer ici qu'un défaut de l'induction de l'immunité innée par l'Il-17 et l'Il-22, deux cytokines produites principalement par les cellules Th17, est un déterminant majeur de la susceptibilité à la candidose chez ces souris transgéniques. Des travaux antérieurs démontrent la déplétion des lymphocytes T CD4⁺ dans la muqueuse buccale, les ganglions cervicaux et le sang périphérique chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutA} (Lewandowski et al. 2006). Par ailleurs, le transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ provenant de souris non-Tg réduit la charge fongique buccale chez les souris CD4C/HIV^{MutA} (Lewandowski et al. 2006).

Fréquence et nombres absolus des lymphocytes T CD4⁺

Les ganglions cervicaux sont utilisés pour l'étude de la fréquence et des nombres absolus de lymphocytes T CD4⁺. Bien que l'évaluation de la fréquence des lymphocytes soit possible directement dans la muqueuse buccale, l'utilisation des ganglions cervicaux permet d'obtenir la fréquence et le nombre absolu de cellules (Lewandowski et al. 2006). Puisque la déplétion du compartiment CD4⁺ fait partie des caractéristiques majeures de l'infection au VIH-1, il est pertinent d'établir la distinction entre la fréquence et le nombre absolu. Par

ailleurs, les lymphocytes T recrutés à la muqueuse buccale proviennent des ganglions cervicaux.

L'étude quantitative des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ localisés dans les ganglions cervicaux révèle que l'expression du transgène cause l'altération du pourcentage de ces sous-populations au jour 7 et au jour 70 (Fig.11). Au jour 7 et au jour 70, la fréquence des lymphocytes Th17 et Treg est augmentée chez la souris Tg, infectée et non-infectée. Par ailleurs, les sous-populations Th1, Th2, Th1Th17 et Th17 sont déplétées au jour 7, tandis que toutes les sous-populations sont déplétées au jour 70.

Le nombre absolu de lymphocytes Th17 est sévèrement réduit, ce qui correspond aux observations chez l'humain (Ancuta et al. 2010, He et al. 2012, Alvarez et al. 2013, Bixler and Mattapallil 2013, Kim et al. 2013, Peng et al. 2013). De prime abord, l'augmentation du pourcentage des lymphocytes Th17 est inattendue, puisque le nombre et la fréquence de ces cellules sont réduits chez l'humain (Ancuta et al. 2010, He et al. 2012, Alvarez et al. 2013, Bixler and Mattapallil 2013, Kim et al. 2013, Peng et al. 2013). Cependant, la baisse de la fréquence des lymphocytes Th17 est associée à la permissivité de ces cellules à l'infection au VIH-1 et à l'expression ou la surexpression des récepteurs du VIH-1 tels que les molécules CCR6, CD4, CXCR4 et $\alpha 4\beta 7$ à la surface des cellules Th17 (Ancuta et al. 2010, Gosselin et al. 2010, Monteiro et al. 2011, Wacleche et al. 2012, Alvarez et al. 2013, Islam et al. 2013). De plus, les lymphocytes Th17 produisent moins de ligands de CCR5, diminuant ainsi la compétition pour l'attachement du virus à ce récepteur (Alvarez et al. 2013). La souris CD4C/HIV^{MutA} exprime le génome du VIH-1 de façon endogène dans toutes les cellules CD4⁺ et exclu ainsi la phase d'attachement du virus. L'effet d'attachement et de déplétion préférentielle des lymphocytes Th17 par le VIH-1 ne peut donc pas être observé chez les souris CD4C/HIV^{MutA}.

L'augmentation de la fréquence des cellules Treg est observée chez l'humain, particulièrement chez les patients ART-naïfs (He et al. 2012, Alvarez et al. 2013, Estes 2013, Jenabian et al. 2013). L'augmentation de la fréquence des Tregs peut être causée par l'induction d'IDO-1 par Nef et Tat du VIH-1 (Smith et al. 2001, Planes and Bahraoui 2013). IDO-1 catabolise le tryptophane en kynurenine, qui favorise l'expression de Foxp3 et la différenciation en cellules Treg, mais inhibe l'expression de ROR- γ t (Jenabian et al. 2013).

Bien que les Tregs soient susceptibles à l'infection par le VIH-1, puisque ces cellules expriment CCR5, les Tregs sont également moins permissives à l'infection au VIH-1, car Foxp3 inhibe la transcription du génome du virus en modulant la liaison de NF- κ B à l'« *enhancer* » du VIH-1 et la liaison de NFAT2 au promoteur du VIH-1 (Chevalier and Weiss 2013). De plus, la liaison de la protéine virale gp120 avec la molécule CD4 inhibe l'apoptose des cellules Treg par la surexpression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2, et l'interaction de gp120 avec les cellules suppressives d'origine myéloïde (MDSC, *Myeloid-derived suppressor cells*) en présence d'Il-6 favorise la prolifération de la sous-population Treg (Nilsson et al. 2006, Ji and Cloyd 2009, Chevalier and Weiss 2013, Garg and Spector 2013). La prolifération de la sous-population Treg en réponse à l'activation exagérée du système immunitaire et l'accumulation des Tregs dans les organes lymphoïdes secondaires et les tissus lymphoïdes des muqueuses expliquent aussi en partie l'augmentation de la fréquence des Tregs dans les ganglions cervicaux (Nilsson et al. 2006, Chevalier and Weiss 2013). Bien que le nombre absolu de Treg demeure inchangé au jour 7, celui-ci diminue de façon significative au jour 70. La déplétion du compartiment Treg chez la souris Tg concorde avec la majorité des observations chez l'humain, qui démontrent une déplétion de cette même sous-population lors de l'infection chronique et progressive au VIH-1 (Schulze Zur Wiesch et al. 2011, Arruvito et al. 2012, Moreno-Fernandez et al. 2012). La divergence entre le jour 7 et le jour 70 peut être expliquée par la provenance tissulaire et le moment du prélèvement. Ainsi, l'étude des lymphocytes T régulateurs chez les macaques infectés au SIV révèle une déplétion des Tregs dans la lamina propria du petit intestin au début de l'infection, alors que la déplétion des Tregs dans les organes lymphoïdes secondaires survient plus tardivement (Chase et al. 2007).

La déplétion des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ (Fig.11) concorde avec la déplétion des précurseurs de ces sous-populations, les lymphocytes T CD4⁺ naïfs (Fig.12). Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs sont déplétés chez l'humain infecté au VIH-1 (Roederer et al. 1995, Sieg et al. 2003, Rodriguez et al. 2011). Malgré l'augmentation de la fréquence des lymphocytes Th17 et Treg chez la souris Tg, il n'en demeure pas moins que le nombre absolu de ces cellules ainsi que de leurs précurseurs est significativement abaissé, ce qui explique la susceptibilité de la souris CD4C/HIV^{MutA} à la candidose oro-pharyngée.

Expression *in vitro* des gènes associés aux sous-populations de lymphocytes T CD4⁺

Les lymphocytes T CD4⁺ naïfs provenant de souris Tg et non-Tg, différenciés *in vitro*, expriment les gènes normalement associés à leurs sous-populations respectives, à l'exception du gène *Il21* (Fig.13). Bien que le gène *Il21* soit exprimé chez les lymphocytes Th1 et Th2, ce sont plutôt les sous-populations Tfh et Th17 qui l'expriment le plus fortement (Wurster et al. 2002, Nurieva et al. 2007, Pallikkuth et al. 2012). Cependant, l'absence de production d'Il-21 dans le surnageant de culture des cellules Th1 indique que l'augmentation de l'expression du gène *Il21* n'est pas directement associée à la sécrétion de la cytokine (Fig.14). De plus, l'expression d'*Il21* n'inhibe pas la production d'IFN- γ chez ces cellules (Fig.14) (Wurster et al. 2002, Suto et al. 2006).

Comparativement aux cellules provenant des souris non-Tg, l'expression de plusieurs gènes est altérée chez les sous-populations lymphocytaires différenciées des souris Tg (Fig.14). Les cellules Th2 expriment davantage *Rora*. Les lymphocytes Th17 augmentent l'expression d'*Ahr*, réduisent l'expression de *Gata3*. De plus, contrairement aux lymphocytes Th17 provenant des souris non-Tg, ces cellules ne réduisent pas l'expression de *Foxp3*. Les Tregs augmentent l'expression d'*Ahr* mais ne réduisent pas l'expression de *Tnf* et *Stat6*. Les cellules naïves contrôles non-différenciées augmentent l'expression d'*Ahr* et *Il17a*.

L'augmentation de l'expression d'*Ahr* chez les cellules Th17, Tregs et contrôles est probablement causée par l'activation chronique de la voie de signalisation de NF- κ B par la protéine nef du VIH-1, puisque l'activation de NF- κ B augmente l'expression d'*Ahr* (Varin et al. 2003, Trifari et al. 2009, Champion et al. 2013). Par ailleurs, *Ahr* est normalement exprimé chez les cellules Th17 et Tregs, car ce facteur de transcription influence la différenciation de ces deux sous-populations en fonction du ligand activant *Ahr* (Quintana et al. 2008). Les cytokines produites par ces sous-populations sont associées à leur phénotype respectif. Toutefois, la production d'Il-21 par les Th17 différenciés est plutôt faible. Cela est aussi observé chez l'humain, puisque l'inhibition du facteur de transcription c-Maf cause la baisse de la production d'Il-21 chez les lymphocytes T CD4⁺ infectés par le VIH-1 *in vitro* (Iannello et al. 2010). De plus, la concentration d'Il-21 est abaissée dans le plasma des patients séropositifs (Iannello et al. 2010, Pallikkuth et al. 2012).

L'absence de la réduction de l'expression de *Foxp3* chez les lymphocytes Th17 provenant des souris Tg peut être causée par plusieurs facteurs. Le catabolisme du tryptophane par IDO favorise la l'expression de *Foxp3* (Jenabian et al. 2013). De plus, le rapport d'expression des gènes *ROR γ t* et *Foxp3* dans les tissus lymphoïdes gastro-intestinaux de patients séropositifs non-traités est en faveur de *Foxp3* : *Foxp3* est significativement augmenté alors que l'expression de *ROR- γ t* demeure inchangée (Rueda et al. 2012, Bixler and Mattapallil 2013). La modification épigénétique du gène *Foxp3* pourrait aussi causer une augmentation de l'expression. En effet, chez les patients séropositifs, le promoteur du gène *Foxp3* est significativement déméthylé comparativement aux témoins sains (Abdel-Hameed et al. 2013). La déméthylation du promoteur favorisant la transcription du gène, l'expression de *Foxp3* est plus élevée chez les individus infectés au VIH-1 (Abdel-Hameed et al. 2013). Par ailleurs, la méthylation est effectuée par la méthyl transférase de l'ADN I (DNMT1), une enzyme dont l'expression est réduite chez les patients séropositifs (Abdel-Hameed et al. 2013). De plus, la liaison de la protéine virale gp120 (une molécule exprimée chez la souris Tg) à la molécule CD4 augmente l'expression de *Foxp3* (Ji and Cloyd 2009). Par contre, la surexpression de *Foxp3* n'inhibe pas la sécrétion d'Il-17 chez les lymphocytes Th17 (Fig.14). Cela n'est pas inattendu, puisqu'il existe des cellules CCR6⁺ *Foxp3*⁺ Il-17⁺ chez l'humain (Voo et al. 2009). Ces cellules sont différenciées *in vitro* en présence des cytokines Il-1 β , Il-2, Il-21, Il-23 et de sérum humain (Voo et al. 2009). Tous ces éléments sont présents soit comme composants du cocktail de polarisation (voir tableau VI), soit par production autocrine, dans le surnageant de culture des lymphocytes Th17 (Fig.14).

La légère baisse de l'expression de *Gata3* chez les cellules Th17 exprimant le transgène est aussi observée chez les individus séropositifs non-traités, dont le tissu lymphoïde gastro-intestinal présente une baisse de l'expression de *Gata3* comparativement aux témoins sains et aux patients séropositifs traités avec HAART (Rueda et al. 2012).

L'expression de *STAT6* n'est pas augmentée chez les cellules Tregs exprimant le transgène (Fig.13). Cela semble logique, puisque Stat6 inhibe la production d'Il-2 ainsi que l'induction de *Foxp3* par la cytokine TGF- β en se liant directement au promoteur de *Foxp3* (Takaki et al. 2008). Il n'y a présentement aucune preuve de la suppression de l'activité de Stat6 par *Foxp3* (Takaki et al. 2008). Par contre, la protéine virale Nef module la voie de

signalisation Il-4/Stat6 en réduisant l'activation de JAK et JAK3, ce qui perturbe la phosphorylation et la translocation de Stat6 vers le noyau (Qiao et al. 2006). De plus, il est possible que Stat6 soit impliqué lors de l'activation complète par le TCR et la différenciation des cellules Tregs spécifiques à un antigène (Sanchez-Guajardo et al. 2007).

Le gène *Il17a* est exprimé plus fortement chez les lymphocytes T CD4⁺ naïfs non-différenciés exprimant le transgène (Fig.13). Chez les patients séropositifs, la proportion de lymphocytes T CD4⁺ du sang périphérique produisant de l'Il-17 est augmentée (Maek et al. 2007). De plus, l'induction du microARN 132/212 sous le contrôle d'Ahr, un facteur de transcription surexprimé chez les lymphocytes T CD4⁺ naïfs témoins exprimant le transgène, favorise la différenciation des cellules productrices d'Il-17 (Nakahama et al. 2013). La surexpression du gène *Il17a* chez les cellules témoins provenant de souris Tg n'a aucun effet sur la production d'Il-17, puisqu'il n'y a aucune différence significative entre la production d'Il-17 par ces cellules et les cellules témoins de souris non-Tg (Fig.14). Les deux groupes contrôles sécrètent faiblement de l'Il-17. Cela pourrait être causé par la stimulation des molécules CD3 et CD28 par les billes anti-CD3/anti-CD28 présentes dans le milieu. En effet, la stimulation *in vitro* de CD3 et CD28 chez les lymphocytes T CD4⁺ naïfs humains cause une faible production d'Il-17 chez ces cellules (Chen et al. 2007).

Production de cytokines chez les lymphocytes T CD4⁺ différenciés *in vitro*

Malgré l'altération du niveau d'expression de gènes par le VIH-1, il n'y a aucune différence significative de production de cytokines chez les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ différenciés exprimant ou non le transgène (Fig.14). De plus, chacune des sous-populations de lymphocytes produit davantage de la cytokine associée à son phénotype (Fig.14). Le manque de corrélation entre l'expression génique et la production de cytokines peut s'expliquer en partie par les mécanismes de post-transcription, l'expression transitoire ou la stabilisation de l'ARN messager (Fan et al. 1998, Fan et al. 2005, Hao and Baltimore 2009, Anderson 2010, Villarino et al. 2011, Chen et al. 2013, Minagawa et al. 2014). De plus, un article récent souligne la difficulté de corréler l'expression génomique et la protéine (Vogel and Marcotte 2012). Malgré l'absence de corrélation entre l'expression des gènes et des

cytokines, il n'en demeure pas moins que la présence du transgène n'affecte pas de façon significative la sécrétion des cytokines. Ces résultats indiquent que les lymphocytes T CD4⁺ exprimant le transgène conservent cette fonction de cellules « *helper* » après la différenciation.

Production de TNF- α et TGF- β dans les ganglions cervicaux *in vivo*

De nombreuses études *in vitro* et *in vivo* démontrent que l'infection au VIH-1 cause l'augmentation de la production de cytokines proinflammatoires, tel que TNF- α (Reuben et al. 1996, Rizzardi et al. 1996, Hittinger et al. 1998, Bergamini et al. 1999, Khanna et al. 2000). Il n'y a pas d'augmentation significative de la concentration de TNF- α dans les ganglions cervicaux de souris Tg, mais une forte tendance (p=0,065) à l'augmentation de la concentration de cette cytokine est néanmoins observée (Fig.15 A). La protéine virale Tat et la glycoprotéine virale gp120 induisent la production de TNF- α (Karsten et al. 1996, Leghmari et al. 2008). L'expression endogène de TNF- α causée par gp120 favorise la réduction de l'expression de la molécule CD4 à la surface cellulaire (Karsten et al. 1996). Cependant, puisque la souris Tg CD4C/HIV^{MutA} n'exprime pas Tat, il est possible que l'expression de la gp120 seule soit insuffisante pour obtenir une hausse significative de la concentration de TNF- α . De plus, la forte concentration de TGF- β observée dans les ganglions cervicaux au jour 7 pourrait inhiber la production de TNF- α (Stevens et al. 1994). Par ailleurs, une hausse significative de la concentration de TNF- α est observée chez un autre modèle murin exprimant les gènes *env*, *nef*, *rev*, *tat*, *vif*, *vpr* et *vpu* du VIH-1 (De et al. 1997, De et al. 2002).

La concentration de TGF- β est plus élevée chez les souris Tg et non-Tg infectées au *C. albicans* (Fig.15 A). L'augmentation de la concentration de TGF- β dans les ganglions cervicaux pourrait favoriser la différenciation des lymphocytes Th17 et Tregs, deux populations cellulaires impliquées dans la résolution de la candidose oro-pharyngée (Pandiyan et al. 2011, Hernandez-Santos and Gaffen 2012). De plus, les cellules de Langerhans et les Tregs sécrètent la cytokine TGF- β en présence d'antigènes de *Candida* (Montagnoli et al. 2002, Haley et al. 2012). Par ailleurs, un modèle de candidose vaginale indique une production constitutive de TGF- β chez les souris non-infectées et une production augmentée de TGF- β suite à l'infection au *C. albicans* (Taylor et al. 2000). Dans ce même modèle, la cytokine TGF-

β prédomine dans les ganglions drainant le site d'infection, tel qu'il est observé à la figure 16 (Taylor et al. 2000). Cependant, il n'y a pas de différence significative entre la concentration de TGF- β des souris Tg et non-Tg, ce qui correspond à une étude effectuée chez l'humain. En effet, la concentration de TGF- β demeure similaire dans le surnageant de culture *ex vivo* de ganglions lymphatiques pelviens des patients séropositifs et des contrôles sains (Biancotto et al. 2007).

Lorsque l'hypocellularité des ganglions cervicaux des souris Tg est prise en compte, il est possible d'observer que le ratio de production de TGF- β en rapport au nombre absolu de cellules est plus élevé chez la souris Tg (Fig.15 B). Ce résultat concorde avec l'augmentation du pourcentage des lymphocytes Th17 et Tregs observé chez les souris Tg (Fig. 12). L'augmentation de la concentration de TGF- β est aussi observée dans les organes lymphoïdes secondaires des patients séropositifs (Estes 2013). De plus, la protéine virale Nef favorise la production de TGF- β et l'accumulation de TGF- β est un facteur important de la fibrose tissulaire, qui est observée dans les organes lymphoïdes secondaires de la souris Tg CD4C/HIV^{MutA} (Hanna et al. 1998, Swingler et al. 1999, de Repentigny et al. 2004, Estes 2013).

À l'instar de TGF- β , le ratio de production de TNF- α en fonction du nombre absolu de cellules contenues dans les ganglions cervicaux est plus élevé chez la souris Tg. Tel que mentionné plus haut, l'expression de la protéine virale gp120 favorise la production de TNF- α , et l'infection au VIH cause l'augmentation de la concentration de cette cytokine (Karsten et al. 1996, Rizzardi et al. 1996). Cependant, la concentration totale de TNF- α n'est pas significativement différente dans les ganglions cervicaux des souris Tg et non-Tg. Ces résultats correspondent à une étude effectuée chez l'humain (Biancotto et al. 2007).

Les concentrations finales des cytokines observées dans les ganglions cervicaux de souris Tg et non-Tg sont similaires. Le transgène ne perturbe donc pas de façon significative la production des cytokines au jour 7 dans les ganglions cervicaux. Cette observation concorde avec une étude *ex vivo* sur les tissus lymphoïdes humains indiquant que l'infection au VIH-1 ne provoque pas d'altérations de la production des cytokines (Audige et al. 2004). Une seconde étude produit des résultats légèrement différents. Ainsi, si la concentration totale *ex vivo* d'IFN- γ , TGF- β et TNF- α demeure inchangée, tel qu'observé à la figure 16 A, les

concentrations *ex vivo* d'Il-1 β , Il-10 et Il-12 sont significativement augmentées (Biancotto et al. 2007). Cependant, puisque les concentrations d'Il-1 β et Il-12 sont très faibles après 15 jours d'incubation (< 10 pg/ml), il est possible que ces cytokines soient indétectables sans incubation (Fig.16 A) (Biancotto et al. 2007). La production d'Il-10 étant induite par la protéine virale Tat, qui est non exprimée chez les souris Tg, il est normal de ne pas observer l'augmentation de sa concentration (Badou et al. 2000, Contreras et al. 2004, Li et al. 2005). Ces résultats indiquent que l'incapacité à résoudre l'infection au *C. albicans* chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutA} ne provient pas d'une perturbation de la différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs dans les ganglions cervicaux.

Charge fongique buccale de *C. albicans* et traitement à l'aide d'Il-17 et Il-22

Lors de l'infection au *C. albicans*, il y a une augmentation significative ($p < 0,05$) de la charge fongique buccale des souris Tg comparativement aux souris non-Tg (Fig.16 A). Cette observation concorde avec les études antérieures de la candidose oro-pharyngée effectuées chez la souris CD4C/HIV^{MutA} (de Repentigny et al. 2002, de Repentigny et al. 2004, Marquis et al. 2006). Le traitement à l'aide de la combinaison des cytokines Il-17 et Il-22 abaisse significativement ($p < 0,05$) la charge fongique buccale chez les souris Tg infectées, comparativement aux souris Tg infectées non-traitées, aux jours 5, 7, 8, 9 et 12 de l'infection au *Candida* (Fig.16 A). De plus, il y a une tendance à l'abaissement de la charge fongique buccale aux jours 6 ($p = 0,123$), 10 ($p = 0,066$) et 11 ($p = 0,198$) chez les souris Tg infectées traitées (Fig.16 A). Cependant, la charge fongique buccale chez les souris Tg infectées traitées demeure plus élevée que chez les souris non-Tg, sauf aux jours 5, 7 et 11 (Fig.17 A). Par ailleurs, l'injection de la cytokine Il-17 seule (à l'exception du jour 7) ou de la cytokine Il-22 seule n'abaisse pas la charge fongique chez les souris Tg infectées, ce qui suggère un effet additif et/ou synergique de l'Il-17 et de l'Il-22 lors de la candidose oro-pharyngée (Fig.17 B et C). Ces résultats confirment l'importance de la réponse Il-17 lors de la candidose (Huang et al. 2004, Conti et al. 2009, van de Veerdonk et al. 2010, Gaffen et al. 2011, Hernandez-Santos and Gaffen 2012, Hernandez-Santos et al. 2013). Les résultats impliquent aussi l'Il-22 lors de la résolution de la candidose, mais l'importance de cette cytokine demeure controversée. En effet, certaines études suggèrent un rôle protecteur de l'Il-22 lors de la candidose (Eyerich et

al. 2008, Liu et al. 2009, De Luca et al. 2010, Eyerich et al. 2011, De Luca et al. 2013), alors que d'autres n'observent pas de rôle essentiel pour l'Il-22 (Conti et al. 2009, Kagami et al. 2010). Par ailleurs, il a déjà été démontré que les cytokines Il-17 et Il-22 coopèrent afin d'augmenter la production de peptides antimicrobiens, ce qui pourrait expliquer la réduction de la charge fongique observée à la figure 16A (Liang et al. 2006). Les résultats présentés ici indiquent que les cytokines Il-17 et Il-22 sont impliqués lors de la résolution de l'infection au *C. albicans* et agissent de concert afin de restaurer partiellement le phénotype protecteur lors de la candidose oro-pharyngée chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutA}.

Il est intéressant de noter que le traitement à l'aide des cytokines Il-17 et Il-22 cause la restauration partielle de la résistance à la candidose uniquement en début d'infection. En effet, il n'y a aucune différence significative entre la charge fongique buccale de *C. albicans* chez les souris Tg, traitées et non-traitées, 13 jours après l'infection (Fig.16A). Cela suggère que la réponse Th17 survient au début de l'infection et que son importance est réduite par la suite, ce qui concorde avec une étude suggérant une réponse à la candidose en plusieurs étapes : une réponse initiale Th17, principalement médiée par l'Il-22, suivie d'une réponse impliquant les lymphocytes Th1 et les Tregs (De Luca et al. 2010). Le traitement à l'Il-17 et l'Il-22 ne compense que la première étape de la réponse suggérée par De Lucas *et al.*, ce qui pourrait expliquer les charges fongiques similaires entre les souris Tg, traitées et non-traitées, 13 jours après l'infection. Par ailleurs, la protéine du VIH-1 gp120 inhibe la sécrétion de la cytokine Il-12 chez les monocytes et les macrophages, mais cette cytokine est nécessaire à la polarisation de la réponse lymphocytaire Th1 (Taoufik et al. 1997). La protéine virale gp120 étant exprimée chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutA}, l'altération de la production d'Il-12 pourrait causer la perturbation de la réponse Th1, nécessaire selon De Lucas *et al.*

Histopathologie de la langue

L'histopathologie de la langue des souris Tg infectées (Fig.17 B1 et B2) et non-infectées (Fig.18 E1 et E2), ainsi que des souris non-Tg infectées (Fig.17 C1 et C2) et non-infectées (Fig.18 F1 et F2), concorde avec les résultats obtenus antérieurement (de Repentigny et al. 2002). Par ailleurs, le nombre et la sévérité des foyers d'infection sont réduits chez la souris Tg traitée à l'aide de la combinaison des cytokines Il-17 et Il-22, comparativement à la souris Tg non-traitée (Fig.17 A2 et B2). Ce résultat concorde avec la réduction de la charge

fongique buccale chez la souris Tg traitée (Fig.16). Cependant, l'augmentation du recrutement des PMNs n'accompagne pas la réduction de la sévérité et du nombre de foyers d'infection chez la souris Tg traitée (Fig.17 A1). De plus, chez les souris Tg traitées, la faible réponse inflammatoire ne rejoint pas la couche kératinisée de l'épithélium (Fig.17 A1). Par conséquent, à l'instar des souris Tg non-traitées, les souris Tg traitées ont un défaut de recrutement et de localisation des cellules inflammatoires, et ce malgré le traitement à l'aide des cytokines Il-17 et Il-22. Malgré le fait que le VIH-1 n'infecte pas les neutrophiles, la perturbation des fonctions de ces cellules est documentée chez les individus séropositifs (Moore et al. 2001, Heit et al. 2006). Les mécanismes causant ces perturbations sont méconnus, mais l'infection au VIH-1 des macrophages et des lymphocytes T CD4⁺ résidant dans la moelle osseuse ainsi que l'altération du profil des cytokines dans la moelle osseuse perturberaient le développement des neutrophiles (Heit et al. 2006). Ainsi, les neutrophiles de patients infectés au VIH-1 expriment moins le récepteur de l'Il-8 à leur surface cellulaire, ce qui cause une réduction sévère du chimiotactisme (Heit et al. 2006). Chez ces patients, la réduction du chimiotactisme corrèle avec le décompte des lymphocytes T CD4⁺ (Heit et al. 2006). Par ailleurs, l'expression du gène *Cxcl15* n'est pas différente ($p>0,05$) chez les souris Tg et non-Tg, comparativement aux souris non-Tg non-infectées. Cependant, même si l'expression de l'ARN messager du gène *Cxcl15* demeure inchangée, il est possible que la sécrétion de CXCL15 soit altérée chez la souris Tg ou que l'expression du récepteur de CXCL15 soit réduite, ce qui pourrait perturber le chimiotactisme des PMNs. L'altération du chimiotactisme des neutrophiles pourrait donc expliquer l'absence de l'augmentation du recrutement des PMNs chez la souris Tg infectée, traitée ou non-traitée. La baisse de la charge fongique et l'absence de l'augmentation du recrutement des PMNs suggèrent que la réduction de la sévérité de la candidose oro-pharyngée est causée par un mécanisme indépendant du recrutement de cellules pro-inflammatoires au site d'infection. En effet, les cytokines Il-17 et Il-22 induisent la production de peptides anti-*Candida*, la calprotectine et les β -défensines (Kao et al. 2004, Liang et al. 2006, Wolk et al. 2006, Eyerich et al. 2011). Ainsi, l'induction de la production de peptides antifongiques lors de l'injection des cytokines Il-17 et Il-22 pourrait augmenter la résistance à la candidose.

Expression des gènes *Defb3*, *Ccl20*, *S100a8*, *Il17* et *Il22* dans la langue

En accord avec les études publiées, la souris non-Tg atteinte de la candidose oropharyngée augmente l'expression des gènes associés à une réponse Th17 (Fig.19): *S100a8*, *Ccl20*, *Il22*, *Il17* et *Defb3* (Schofield et al. 2004, Liang et al. 2006, Wolk et al. 2006, Conti et al. 2009, Harper et al. 2009, De Luca et al. 2010, Hernandez-Santos and Gaffen 2012, De Luca et al. 2013, Hernandez-Santos et al. 2013). Cela concorde avec la réduction massive de la charge fongique buccale (Fig.16 A) et le nombre réduit de foyers d'infection (Fig.17) à l'examen histopathologique de la muqueuse buccale.

Cependant, chez les souris Tg infectées, les niveaux d'expression des gènes *S100a8*, *Ccl20*, *Il22* et *Il17* ne sont pas différents du niveau d'expression de ces gènes chez les souris Tg ou non-Tg, non-infectées. L'absence d'augmentation de l'expression d'*Il17* et d'*Il22* pourrait expliquer l'absence de la surexpression de *S100a8* et *Ccl20*, puisque ces deux cytokines induisent la production de la calprotectine et de Ccl20 (Liang et al. 2006, Wolk et al. 2006, Harper et al. 2009). D'ailleurs, la concentration salivaire de la calprotectine est augmentée chez les patients séronégatifs atteints de la candidose, mais cette concentration est réduite dans la salive des individus séropositifs (Sweet et al. 2001). De plus, alors que *C. albicans* induit la production de Ccl20, le contact de la peau du prépuce avec des cellules mononucléées infectées au VIH-1 réduit la sécrétion de Ccl20 *in vitro* (Moyes et al. 2011, Zhou et al. 2011). Ainsi, la présence du *C. albicans* et l'expression du transgène chez la souris Tg infectée pourraient masquer leurs effets individuels respectifs. Chez la souris Tg, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ est réduit dans la muqueuse buccale, les ganglions cervicaux et le sang périphérique (de Repentigny et al. 2002), les sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ sont réduites dans les ganglions cervicaux (Fig.11) et leurs précurseurs sont sévèrement déplétés (Fig.12). L'absence d'induction de l'expression des gènes *Il17* et *Il22* chez la souris Tg pourrait donc être causée par la réduction de la sous-population Th17, principalement responsable de la production de l'Il-17 et de l'Il-22. Par contre, puisqu'il n'y a pas de sous-expression du gène *Il17* chez les souris Tg comparativement aux souris non-Tg, d'autres populations cellulaires productrices d'Il-17, les lymphocytes CD8⁺ Il17⁺ (Tc17), les cellules CD4⁻ CD8⁻, les lymphocytes $\gamma\delta$, cellules NK, et les cellules lymphoïdes innées pourraient avoir en partie comblé la déplétion des cellules Th17 (Nigam et al. 2011, Hernandez-Santos and Gaffen 2012, Hernandez-Santos et al. 2013). En effet, des études démontrent que ces

populations produisent de l'Il-17 lorsque le compartiment des lymphocytes T CD4⁺ est déplété (Fenoglio et al. 2009, Fidel 2011, Nigam et al. 2011). *Defb3* est le seul gène dont l'expression est induite normalement chez la souris Tg infectée au *C. albicans*. Cela est surprenant, puisque les cytokines Il-17 et Il-22, qui induisent la production de la β -défensine 3 (Wolk et al. 2004, Quesniaux et al. 2013), ne sont pas elles-mêmes induites chez ces souris. Chez l'humain, la protéine virale Tat cause l'augmentation de la production de la β -défensine 2, l'homologue de mBD-3, chez les lymphocytes B (Ju et al. 2012). Puisque Tat n'est pas exprimé chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutA}, il est normal de ne pas observer une expression plus grande de *Defb3*, comparativement à la souris non-Tg infectée. Cependant, le phospholipomannane de *C. albicans* induit l'expression des β -défensines 2 et 3 ainsi que de la cathélicidine (LL-37) par les kératinocytes humains *in vitro* (Li et al. 2011). La reconnaissance directe de *C. albicans* par les kératinocytes, qui n'expriment pas le transgène VIH-1, pourrait expliquer l'induction de l'expression de *Defb3* chez la souris Tg infectée. L'ensemble de ces résultats indique que l'expression du transgène VIH-1 abolit la capacité des souris Tg à augmenter l'expression les gènes *S100a8*, *Ccl20*, *Il22* et *Il17* lors de la candidose oro-pharyngée.

Le traitement à l'aide des cytokines Il-17 et Il-22 restaure l'expression des gènes *S100a8*, *Ccl20* et *Il22*, mais pas du gène *Il17*. L'induction des gènes *S100a8*, *Ccl20* et *Defb3* correspond au résultat attendu, puisque l'expression de ces gènes est induite par l'Il-17 et l'Il-22, et concorde avec la réduction de la charge fongique buccale observée chez les souris Tg infectées traitées (Fig.17 A) (Schofield et al. 2004, Kao et al. 2005, Liang et al. 2006, Wolk et al. 2006, Conti et al. 2009, Harper et al. 2009, Kanda et al. 2009). L'augmentation de l'expression du gène *Il22* par le traitement à l'Il-17 et l'Il-22 est au départ surprenante, mais pourrait s'expliquer par l'amplification et la rétroaction positive de l'Il-22 par la voie de signalisation de STAT3. En effet, l'Il-22 active le facteur de transcription STAT3 chez les kératinocytes (Wolk et al. 2009). L'activation de STAT3 augmente la production d'Il-6 (Yoshizaki et al. 1990, Quesniaux et al. 2013). Par la suite, l'Il-6 induit STAT3 et AhR, deux facteurs de transcription impliqués dans la production d'Il-22 chez les lymphocytes (Zheng et al. 2007, Toth et al. 2011). Il y a donc augmentation de la production d'Il-22 et d'Il-6. Par ailleurs, Nef et gp120 du VIH-1 activent le facteur de transcription STAT3, ce qui pourrait favoriser l'induction de la production de l'Il-22 chez les lymphocytes T CD4⁺ (Kohler et al. 2003, Percario et al. 2003). L'absence d'induction du gène *Il17* suite à ce traitement à l'Il-17

et l'Il-22 est surprenante, car la production d'Il-17 implique aussi le facteur de transcription STAT3 (Camporeale and Poli 2012). Cependant, l'Il-17a inhibe l'expansion des lymphocytes T producteurs d'Il-17 *in vitro*, par la liaison au récepteur de l'Il-17, Il-17R (Smith et al. 2008). Il est possible que la quantité non-physiologique d'Il-17 injectée (3 µg) ait causée l'inhibition de la production d'Il-17 chez les cellules présentes dans la langue des souris Tg infectées.

Conclusion

Le traitement à l'aide des cytokines Il-17 et Il-22 induit l'expression de *S100a8*, *Ccl20* et *Il22* chez la souris Tg lors de l'infection au *C. albicans*, ce qui restaure partiellement le phénotype de résistance à la candidose, tel que démontré par la réduction du nombre de foyers d'infection et la diminution de la charge fongique buccale. Les applications thérapeutiques potentielles de l'injection d'Il-17 et Il-22 afin de réduire la susceptibilité à la candidose pourraient être prometteuses et nécessitent des études supplémentaires.

Bien que la perturbation de la réponse mucosale induite par l'Il-17 et l'Il-22 soit impliquée dans la sensibilité à la candidose chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutA}, cette perturbation n'explique pas complètement la réduction progressive de la charge fongique chez la souris transgénique non-traitée. Cette réduction progressive suggère l'implication de d'autres sous-populations productrices d'Il-17 dans la réponse à la candidose, telles que les lymphocytes T $\gamma\delta$, les cellules Tc17 CD8⁺, les cellules NK et les cellules lymphoïdes innées (Akdis et al. 2012, Bixler and Mattapallil 2013, Feller et al. 2013). Il est possible que ces populations cellulaires aient un effet protecteur dans le contexte de la déplétion du compartiment CD4⁺ (Hernandez-Santos and Gaffen 2012). Les lymphocytes T $\gamma\delta$ et les cellules NK contribuent peu à l'immunité mucosale médiée par Il-17. Cependant, les lymphocytes T CD8⁺ contribuent à la défense de l'hôte contre la candidose, et il a été démontré que ces cellules sont recrutées chez la souris transgénique lors de l'infection et compensent en partie la perte du compartiment CD4⁺ (Lewandowski et al. 2006, Marquis et al. 2006, Conti et al. 2009). Il serait donc pertinent de caractériser cette population afin de déterminer s'il s'agit du phénotype Tc17 CD8⁺. Les cellules lymphoïdes innées pourraient aussi contribuer à la production d'Il-17, car cette population n'est pas déplétée dans la muqueuse buccale de macaques infectés par le SIV (Li and Reeves 2012, Xu et al. 2012, Gladiator et al. 2013).

Les travaux présentés ici ont permis de déterminer que les cytokines Il-17 et Il-22 jouent donc un rôle protecteur l'immunité mucosale, et que la déficience de ces deux cytokines joue un rôle déterminant dans la susceptibilité à la candidose oro-pharyngée chez la

souris transgénique exprimant le génome du VIH-1 par la réduction de la production de peptides antifongiques.

Bibliographie

Abdel-Hameed, E. A., H. Ji, K. E. Sherman and M. T. Shata (2013). "Epigenetic modification of FOXP3 in patients with chronic HIV infection." J Acquir Immune Defic Syndr.

Abtin, A., L. Eckhart, R. Glaser, R. Gmeiner, M. Mildner and E. Tschachler (2010). "The antimicrobial heterodimer S100A8/S100A9 (calprotectin) is upregulated by bacterial flagellin in human epidermal keratinocytes." J Invest Dermatol **130**(10): 2423-2430.

Acosta-Rodriguez, E. V., G. Napolitani, A. Lanzavecchia and F. Sallusto (2007). "Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells." Nat Immunol **8**(9): 942-949.

Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, J. Geginat, D. Jarrossay, M. Gattorno, A. Lanzavecchia, F. Sallusto and G. Napolitani (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." Nat Immunol **8**(6): 639-646.

Akdis, M., O. Palomares, W. van de Veen, M. van Splunter and C. A. Akdis (2012). "TH17 and TH22 cells: a confusion of antimicrobial response with tissue inflammation versus protection." J Allergy Clin Immunol **129**(6): 1438-1449; quiz1450-1431.

Al-Fattani, M. A. and L. J. Douglas (2006). "Biofilm matrix of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*: chemical composition and role in drug resistance." J Med Microbiol **55**(Pt 8): 999-1008.

Albanesi, C., A. Cavani and G. Girolomoni (1999). "IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha." J Immunol **162**(1): 494-502.

Albanesi, C., C. Scarponi, A. Cavani, M. Federici, F. Nasorri and G. Girolomoni (2000). "Interleukin-17 is produced by both Th1 and Th2 lymphocytes, and modulates interferon-gamma- and interleukin-4-induced activation of human keratinocytes." J Invest Dermatol **115**(1): 81-87.

Albrecht, A., A. Felk, I. Pichova, J. R. Naglik, M. Schaller, P. de Groot, D. Maccallum, F. C. Odds, W. Schafer, F. Klis, M. Monod and B. Hube (2006). "Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteases of *Candida albicans* target proteins necessary for both cellular processes and host-pathogen interactions." J Biol Chem **281**(2): 688-694.

Albuquerque, P. and A. Casadevall (2012). "Quorum sensing in fungi--a review." Med Mycol **50**(4): 337-345.

Aliahmadi, E., R. Gramlich, A. Grutzkau, M. Hitzler, M. Kruger, R. Baumgrass, M. Schreiner, B. Wittig, R. Wanner and M. Peiser (2009). "TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1beta, TGF-beta and IL-23." Eur J Immunol **39**(5): 1221-1230.

Altfeld, M., G. Behrens, P. Braun, U. F. Bredeek, T. Buhk, R. Camp, C. Eggers, S. Esser, G. Fätkenheuer, A. Gori, T. Harrer, C. Herzmann, C. Hoffmann, H.-A. Horst, M. Hower, P. Krings, C. Lange, T. Lorenzen, C. Mayr, G. Battista Migliori, T. Neumann, T. Niehues, C. Noah, F. Ochsendorf, R. Pauli, M. Ostrowski, A. Rieke, J. Rockstroh, T. Rosenkranz, A. Rubbert-Roth, B. Schaaf, C. Schieferstein-Knauer, R. E. Schmidt, H. Schöfer, U. Sonnenberg-Schwan, M. Stoll, H. Streeck, J. Thoden, N. Venhoff, M. Vocks-Hauck, U. A. Walker, J.-C. Wasmuth, M. Weigel, T. Weitzel and E. Wolf (2012). HIV 2012/1013. www.hivbook.com. C. Hoffmann and J. K. Rockstroh. Hamburg, Medizin Fokus Verlag: 742.

Alvarez, Y., M. Tuen, G. Shen, F. Nawaz, J. Arthos, M. J. Wolff, M. A. Poles and C. E. Hioe (2013). "Preferential HIV Infection of CCR6+ Th17 Cells Is Associated with Higher Levels of Virus Receptor Expression and Lack of CCR5 Ligands." J Virol **87**(19): 10843-10854.

Ancuta, P., P. Monteiro and R. P. Sekaly (2010). "Th17 lineage commitment and HIV-1 pathogenesis." Curr Opin HIV AIDS **5**(2): 158-165.

Anderson, P. (2010). "Post-transcriptional regulons coordinate the initiation and resolution of inflammation." Nat Rev Immunol **10**(1): 24-35.

Annunziato, F., L. Cosmi, F. Liotta, E. Maggi and S. Romagnani (2009). "Human Th17 cells: are they different from murine Th17 cells?" Eur J Immunol **39**(3): 637-640.

Annunziato, F. and S. Romagnani (2009). "Do studies in humans better depict Th17 cells?" Blood **114**(11): 2213-2219.

- Ansell, G. B. and J. N. Hawthorne (1964). Phospholipids: chemistry, metabolism and function. Amsterdam, New York,, Elsevier Pub. Co.
- Arancia, G., A. Stringaro, P. Crateri, A. Torosantucci, C. Ramoni, F. Urbani, C. M. Ausiello and A. Cassone (1998). "Interaction between human interleukin-2-activated natural killer cells and heat-killed germ tube forms of *Candida albicans*." Cell Immunol **186**(1): 28-38.
- Arruvito, L., J. Sabatte, J. Pandolfi, P. Baz, L. A. Billordo, M. B. Lasala, H. Salomon, J. Geffner and L. Fainboim (2012). "Analysis of suppressor and non-suppressor FOXP3+ T cells in HIV-1-infected patients." PLoS One **7**(12): e52580.
- Audige, A., E. Schlaepfer, A. Bonanomi, H. Joller, M. C. Knuchel, M. Weber, D. Nadal and R. F. Speck (2004). "HIV-1 does not provoke alteration of cytokine gene expression in lymphoid tissue after acute infection ex vivo." J Immunol **172**(4): 2687-2696.
- Badou, A., Y. Bennasser, M. Moreau, C. Leclerc, M. Benkirane and E. Bahraoui (2000). "Tat protein of human immunodeficiency virus type 1 induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: implication of protein kinase C-dependent pathway." J Virol **74**(22): 10551-10562.
- Baev, D., X. S. Li, J. Dong, P. Keng and M. Edgerton (2002). "Human salivary histatin 5 causes disordered volume regulation and cell cycle arrest in *Candida albicans*." Infect Immun **70**(9): 4777-4784.
- Bai, B., K. Yamamoto, H. Sato, H. Sugiura and T. Tanaka (2007). "Complex regulation of S100A8 by IL-17, dexamethasone, IL-4 and IL-13 in HaCat cells (human keratinocyte cell line)." J Dermatol Sci **47**(3): 259-262.
- Balish, E., H. Filutowicz and T. D. Oberley (1990). "Correlates of cell-mediated immunity in *Candida albicans*-colonized gnotobiotic mice." Infect Immun **58**(1): 107-113.
- Balish, E., J. Jensen, T. Warner, J. Brekke and B. Leonard (1993). "Mucosal and disseminated candidiasis in gnotobiotic SCID mice." J Med Vet Mycol **31**(2): 143-154.
- Balish, E., F. A. Vazquez-Torres, J. Jones-Carson, R. D. Wagner and T. Warner (1996). "Importance of beta2-microglobulin in murine resistance to mucosal and systemic candidiasis." Infect Immun **64**(12): 5092-5097.

- 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**(3): 261-268.
- Bals, R., M. J. Goldman and J. M. Wilson (1998). "Mouse beta-defensin 1 is a salt-sensitive antimicrobial peptide present in epithelia of the lung and urogenital tract." Infect Immun **66**(3): 1225-1232.
- Bando, M., X. Zou, Y. Hiroshima, M. Kataoka, K. F. Ross, Y. Shinohara, T. Nagata, M. C. Herzberg and J. Kido (2013). "Mechanism of interleukin-1alpha transcriptional regulation of S100A9 in a human epidermal keratinocyte cell line." Biochim Biophys Acta **1829**(9): 954-962.
- Banno, T., A. Gazel and M. Blumenberg (2004). "Effects of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) in epidermal keratinocytes revealed using global transcriptional profiling." J Biol Chem **279**(31): 32633-32642.
- Barabas, N., J. Rohrl, E. Holler and T. Hehlhans (2013). "Beta-defensins activate macrophages and synergize in pro-inflammatory cytokine expression induced by TLR ligands." Immunobiology **218**(7): 1005-1011.
- Barbeau, J. and N. Deslauriers (1989). "Phenotypic and functional analysis of oral mucosal macrophages." Reg Immunol **2**(5): 285-293.
- Barnett, J. A. (2004). "A history of research on yeasts 8: taxonomy." Yeast **21**(14): 1141-1193.
- Barnett, J. A., R. W. Payne and D. Yarrow (2000). Yeasts : characteristics and identification. Cambridge, U.K. ; New York, NY, Cambridge University Press.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, C. Axler-Blin, F. Vezinet-Brun, C. Rouzioux, W. Rozenbaum and L. Montagnier (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." Science **220**(4599): 868-871.
- Barrientos, S., O. Stojadinovic, M. S. Golinko, H. Brem and M. Tomic-Canic (2008). "Growth factors and cytokines in wound healing." Wound Repair Regen **16**(5): 585-601.

- Beck, J. M. (2005). "The immunocompromised host: HIV infection." Proc Am Thorac Soc **2**(5): 423-427.
- Bending, D., H. De la Pena, M. Veldhoen, J. M. Phillips, C. Uyttenhove, B. Stockinger and A. Cooke (2009). "Highly purified Th17 cells from BDC2.5NOD mice convert into Th1-like cells in NOD/SCID recipient mice." J Clin Invest **119**(3): 565-572.
- Beno, D. W., A. G. Stover and H. L. Mathews (1995). "Growth inhibition of *Candida albicans* hyphae by CD8+ lymphocytes." J Immunol **154**(10): 5273-5281.
- Bercier, J. G., I. Al-Hashimi, N. Haghghat, T. D. Rees and F. G. Oppenheim (1999). "Salivary histatins in patients with recurrent oral candidiasis." J Oral Pathol Med **28**(1): 26-29.
- Bergamini, A., E. Faggioli, F. Bolacchi, S. Gessani, L. Cappannoli, I. Uccella, F. Demin, M. Capozzi, R. Cicconi, R. Placido, S. Vendetti, G. M. Colizzi and G. Rocchi (1999). "Enhanced production of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 due to prolonged response to lipopolysaccharide in human macrophages infected in vitro with human immunodeficiency virus type 1." J Infect Dis **179**(4): 832-842.
- Berger, C. L., J. G. Vasquez, J. Shofner, K. Mariwalla and R. L. Edelson (2006). "Langerhans cells: mediators of immunity and tolerance." Int J Biochem Cell Biol **38**(10): 1632-1636.
- Berman, J. and P. E. Sudbery (2002). "Candida Albicans: a molecular revolution built on lessons from budding yeast." Nat Rev Genet **3**(12): 918-930.
- Biancotto, A., J. C. Grivel, S. J. Iglehart, C. Vanpouille, A. Lisco, S. F. Sieg, R. Debernardo, K. Garate, B. Rodriguez, L. B. Margolis and M. M. Lederman (2007). "Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1." Blood **109**(10): 4272-4279.
- Bixler, S. L. and J. J. Mattapallil (2013). "Loss and dysregulation of Th17 cells during HIV infection." Clin Dev Immunol **2013**: 852418.
- Bleul, C. C., L. Wu, J. A. Hoxie, T. A. Springer and C. R. Mackay (1997). "The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(5): 1925-1930.

- Blume, R. S., G. A. Padgett, S. M. Wolff and J. M. Bennett (1969). "Giant neutrophil granules in the Chediak-Higashi syndrome of man, mink, cattle and mice." Can J Comp Med **33**(4): 271-274.
- Boasso, A., J. P. Herbeuval, A. W. Hardy, S. A. Anderson, M. J. Dolan, D. Fuchs and G. M. Shearer (2007). "HIV inhibits CD4+ T-cell proliferation by inducing indoleamine 2,3-dioxygenase in plasmacytoid dendritic cells." Blood **109**(8): 3351-3359.
- Bolduc, C., J. D. Waterfield and N. Deslauriers (1990). "Tissue distribution and cytofluorometric analysis of oral mucosal T cells in the BALB/c mouse." Res Immunol **141**(6): 461-475.
- Boniface, K., F. X. Bernard, M. Garcia, A. L. Gurney, J. C. Lecron and F. Morel (2005). "IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes." J Immunol **174**(6): 3695-3702.
- Bosma, M. J. and A. M. Carroll (1991). "The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses." Annu Rev Immunol **9**: 323-350.
- Brenchley, J. M., M. Paiardini, K. S. Knox, A. I. Asher, B. Cervasi, T. E. Asher, P. Scheinberg, D. A. Price, C. A. Hage, L. M. Kholi, A. Khoruts, I. Frank, J. Else, T. Schacker, G. Silvestri and D. C. Douek (2008). "Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections." Blood **112**(7): 2826-2835.
- Brenchley, J. M., D. A. Price, T. W. Schacker, T. E. Asher, G. Silvestri, S. Rao, Z. Kazzaz, E. Bornstein, O. Lambotte, D. Altmann, B. R. Blazar, B. Rodriguez, L. Teixeira-Johnson, A. Landay, J. N. Martin, F. M. Hecht, L. J. Picker, M. M. Lederman, S. G. Deeks and D. C. Douek (2006). "Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection." Nat Med **12**(12): 1365-1371.
- Brucklacher-Waldert, V., K. Steinbach, M. Lioznov, M. Kolster, C. Holscher and E. Tolosa (2009). "Phenotypical characterization of human Th17 cells unambiguously identified by surface IL-17A expression." J Immunol **183**(9): 5494-5501.

Burd, R. S., J. L. Furrer, J. Sullivan and A. L. Smith (2002). "Murine beta-defensin-3 is an inducible peptide with limited tissue expression and broad-spectrum antimicrobial activity." Shock **18**(5): 461-464.

Calderone, R. A. (2002). Candida and candidiasis. Washington, D.C., ASM Press.

Calderone, R. A. and W. A. Fonzi (2001). "Virulence factors of *Candida albicans*." Trends Microbiol **9**(7): 327-335.

Camporeale, A. and V. Poli (2012). "IL-6, IL-17 and STAT3: a holy trinity in auto-immunity?" Front Biosci (Landmark Ed) **17**: 2306-2326.

Cantorna, M. T. and E. Balish (1990). "Mucosal and systemic candidiasis in congenitally immunodeficient mice." Infect Immun **58**(4): 1093-1100.

Cassol, E., L. Cassetta, M. Alfano and G. Poli (2010). "Macrophage polarization and HIV-1 infection." J Leukoc Biol **87**(4): 599-608.

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**(12): 1457-1472.

Chai, L. Y., M. G. Netea, A. G. Vonk and B. J. Kullberg (2009). "Fungal strategies for overcoming host innate immune response." Med Mycol **47**(3): 227-236.

Challacombe, S. J. and S. P. Sweet (1997). "Salivary and mucosal immune responses to HIV and its co-pathogens." Oral Dis **3 Suppl 1**: S79-84.

Chaly, Y. V., E. M. Paleolog, T. S. Kolesnikova, Tikhonov, II, E. V. Petratchenko and N. N. Voitenok (2000). "Neutrophil alpha-defensin human neutrophil peptide modulates cytokine production in human monocytes and adhesion molecule expression in endothelial cells." Eur Cytokine Netw **11**(2): 257-266.

Chamilos, G., M. S. Lionakis, R. E. Lewis and D. P. Kontoyiannis (2007). "Role of mini-host models in the study of medically important fungi." Lancet Infect Dis **7**(1): 42-55.

- Champion, S., C. Sauzet, P. Bremond, K. Benbrahim, J. Abraldes, E. Seree, Y. Barra and P. H. Villard (2013). "Activation of the NFkB Pathway Enhances AhR Expression in Intestinal Caco-2 Cells." ISRN Toxicology **2013**: 7.
- Chase, A. J., A. R. Sedaghat, J. R. German, L. Gama, M. C. Zink, J. E. Clements and R. F. Siliciano (2007). "Severe depletion of CD4+ CD25+ regulatory T cells from the intestinal lamina propria but not peripheral blood or lymph nodes during acute simian immunodeficiency virus infection." J Virol **81**(23): 12748-12757.
- Chattopadhyay, A., L. R. Gray, L. L. Patton, D. J. Caplan, G. D. Slade, H. C. Tien and D. C. Shugars (2004). "Salivary secretory leukocyte protease inhibitor and oral candidiasis in human immunodeficiency virus type 1-infected persons." Infect Immun **72**(4): 1956-1963.
- 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**(14): 5048-5052.
- Chen, J., J. Cascio, J. D. Magee, P. Techasintana, M. M. Gubin, G. M. Dahm, R. Calaluce, S. Yu and U. Atasoy (2013). "Posttranscriptional gene regulation of IL-17 by the RNA-binding protein HuR is required for initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **191**(11): 5441-5450.
- Chen, V. L., D. S. France and G. P. Martinelli (1986). "De novo synthesis of lysozyme by human epidermal cells." J Invest Dermatol **87**(5): 585-587.
- Chen, Y., C. J. Haines, I. Gutcher, K. Hochweller, W. M. Blumenschein, T. McClanahan, G. Hammerling, M. O. Li, D. J. Cua and M. J. McGeachy (2011). "Foxp3(+) regulatory T cells promote T helper 17 cell development in vivo through regulation of interleukin-2." Immunity **34**(3): 409-421.
- Chen, Z., C. M. Tato, L. Muul, A. Laurence and J. J. O'Shea (2007). "Distinct regulation of interleukin-17 in human T helper lymphocytes." Arthritis Rheum **56**(9): 2936-2946.
- Cheng, S. C., F. van de Veerdonk, S. Smeekens, L. A. Joosten, J. W. van der Meer, B. J. Kullberg and M. G. Netea (2010). "Candida albicans dampens host defense by downregulating IL-17 production." J Immunol **185**(4): 2450-2457.

Chevalier, M. F. and L. Weiss (2013). "The split personality of regulatory T cells in HIV infection." Blood **121**(1): 29-37.

Chihara, T., M. Hashimoto, A. Osman, Y. Hiyoshi-Yoshidomi, I. Suzu, N. Chutiwitoonchai, M. Hiyoshi, S. Okada and S. Suzu (2012). "HIV-1 proteins preferentially activate anti-inflammatory M2-type macrophages." J Immunol **188**(8): 3620-3627.

Christin, L., D. R. Wysong, T. Meshulam, S. Wang and R. D. Diamond (1997). "Mechanisms and target sites of damage in killing of *Candida albicans* hyphae by human polymorphonuclear neutrophils." J Infect Dis **176**(6): 1567-1578.

Clemons, K. V. and D. A. Stevens (2000). "Treatment of orogastrointestinal candidosis in SCID mice with fluconazole alone or in combination with recombinant granulocyte colony-stimulating factor or interferon-gamma." Med Mycol **38**(3): 213-219.

Colasante, A., S. Rosini, A. Piattelli, L. Artese, F. B. Aiello and P. Musiani (1992). "Distribution and phenotype of immune cells in normal human gingiva: active immune response versus unresponsiveness." J Oral Pathol Med **21**(1): 12-16.

Coleman, C. M. and L. Wu (2009). "HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs." Retrovirology **6**: 51.

Companjen, A. R., V. H. van der Velden, A. Vooy, R. Debets, R. Benner and E. P. Prens (2000). "Human keratinocytes are major producers of IL-18: predominant expression of the unprocessed form." Eur Cytokine Netw **11**(3): 383-390.

Conti, H. R., O. Baker, A. F. Freeman, W. S. Jang, S. M. Holland, R. A. Li, M. Edgerton and S. L. Gaffen (2011). "New mechanism of oral immunity to mucosal candidiasis in hyper-IgE syndrome." Mucosal Immunol **4**(4): 448-455.

Conti, H. R., F. Shen, N. Nayyar, E. Stocum, J. N. Sun, M. J. Lindemann, A. W. Ho, J. H. Hai, J. J. Yu, J. W. Jung, S. G. Filler, P. Masso-Welch, M. Edgerton and S. L. Gaffen (2009). "Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis." J Exp Med **206**(2): 299-311.

- Contreras, X., Y. Bennasser and E. Bahraoui (2004). "IL-10 production induced by HIV-1 Tat stimulation of human monocytes is dependent on the activation of PKC beta(II) and delta isozymes." Microbes Infect **6**(13): 1182-1190.
- Coomes, S. M., V. S. Pelly and M. S. Wilson (2013). "Plasticity within the alphabeta(+)CD4(+) T-cell lineage: when, how and what for?" Open Biol **3**(1): 120157.
- Costa, A. C., C. A. Pereira, J. C. Junqueira and A. O. Jorge (2013). "Recent mouse and rat methods for the study of experimental oral candidiasis." Virulence **4**(5): 391-399.
- Costin, J. M. (2007). "Cytopathic mechanisms of HIV-1." Virology **4**: 100.
- Coursey, T. G., N. B. Gandhi, E. A. Volpe, S. C. Pflugfelder and C. S. de Paiva (2013). "Chemokine receptors CCR6 and CXCR3 are necessary for CD4(+) T cell mediated ocular surface disease in experimental dry eye disease." PLoS One **8**(11): e78508.
- Cox, C. A., G. Shi, H. Yin, B. P. Vistica, E. F. Wawrousek, C. C. Chan and I. Gery (2008). "Both Th1 and Th17 are immunopathogenic but differ in other key biological activities." J Immunol **180**(11): 7414-7422.
- Cunningham, A. L., F. Carbone and T. B. Geijtenbeek (2008). "Langerhans cells and viral immunity." Eur J Immunol **38**(9): 2377-2385.
- D'Ambrosio, D., M. Mariani, P. Panina-Bordignon and F. Sinigaglia (2001). "Chemokines and their receptors guiding T lymphocyte recruitment in lung inflammation." Am J Respir Crit Care Med **164**(7): 1266-1275.
- D'Apuzzo, M., A. Rolink, M. Loetscher, J. A. Hoxie, I. Clark-Lewis, F. Melchers, M. Baggiolini and B. Moser (1997). "The chemokine SDF-1, stromal cell-derived factor 1, attracts early stage B cell precursors via the chemokine receptor CXCR4." Eur J Immunol **27**(7): 1788-1793.
- Damo, S. M., T. E. Kehl-Fie, N. Sugitani, M. E. Holt, S. Rathi, W. J. Murphy, Y. Zhang, C. Betz, L. Hench, G. Fritz, E. P. Skaar and W. J. Chazin (2013). "Molecular basis for manganese sequestration by calprotectin and roles in the innate immune response to invading bacterial pathogens." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(10): 3841-3846.

- Daniels, K. J., T. Srikantha, S. R. Lockhart, C. Pujol and D. R. Soll (2006). "Opaque cells signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*." EMBO J **25**(10): 2240-2252.
- Darwich, L., G. Coma, R. Pena, R. Bellido, E. J. Blanco, J. A. Este, F. E. Borrás, B. Clotet, L. Ruiz, A. Rosell, F. Andreo, R. M. Parkhouse and M. Bofill (2009). "Secretion of interferon-gamma by human macrophages demonstrated at the single-cell level after costimulation with interleukin (IL)-12 plus IL-18." Immunology **126**(3): 386-393.
- Davis, D. A. (2009). "How human pathogenic fungi sense and adapt to pH: the link to virulence." Curr Opin Microbiol **12**(4): 365-370.
- Davis, M. J., T. M. Tsang, Y. Qiu, J. K. Dayrit, J. B. Freij, G. B. Huffnagle and M. A. Olszewski (2013). "Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection." MBio **4**(3): e00264-00213.
- De Luca, A., A. Carvalho, C. Cunha, R. G. Iannitti, L. Pitzurra, G. Giovannini, A. Mencacci, L. Bartolommei, S. Moretti, C. Massi-Benedetti, D. Fuchs, F. De Bernardis, P. Puccetti and L. Romani (2013). "IL-22 and IDO1 affect immunity and tolerance to murine and human vaginal candidiasis." PLoS Pathog **9**(7): e1003486.
- De Luca, A., T. Zelante, C. D'Angelo, S. Zagarella, F. Fallarino, A. Spreca, R. G. Iannitti, P. Bonifazi, J. C. Renauld, F. Bistoni, P. Puccetti and L. Romani (2010). "IL-22 defines a novel immune pathway of antifungal resistance." Mucosal Immunol **3**(4): 361-373.
- de Repentigny, L. (2004). "Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions." Curr Opin Microbiol **7**(4): 324-329.
- de Repentigny, L., F. Aumont, J. S. Ripeau, M. Fiorillo, D. G. Kay, Z. Hanna and P. Jolicoeur (2002). "Mucosal candidiasis in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1." J Infect Dis **185**(8): 1103-1114.
- de Repentigny, L., D. Lewandowski and P. Jolicoeur (2004). "Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection." Clin Microbiol Rev **17**(4): 729-759, table of contents.

De, S. K., K. Devadas and A. L. Notkins (2002). "Elevated levels of tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) in human immunodeficiency virus type 1-transgenic mice: prevention of death by antibody to TNF-alpha." J Virol **76**(22): 11710-11714.

De, S. K., C. R. Wohlenberg, N. J. Marinos, D. Doodnauth, J. L. Bryant and A. L. Notkins (1997). "Human chorionic gonadotropin hormone prevents wasting syndrome and death in HIV-1 transgenic mice." J Clin Invest **99**(7): 1484-1491.

den Hertog, A. L., J. van Marle, H. A. van Veen, W. Van't Hof, J. G. Bolscher, E. C. Veerman and A. V. Nieuw Amerongen (2005). "Candidacidal effects of two antimicrobial peptides: histatin 5 causes small membrane defects, but LL-37 causes massive disruption of the cell membrane." Biochem J **388**(Pt 2): 689-695.

Depont, F., F. Vargas, H. Dutronc, E. Giaque, J. M. Ragnaud, T. Galperine, A. Abouelfath, R. Valentino, M. Dupon, G. Hebert and N. Moore (2007). "Drug-drug interactions with systemic antifungals in clinical practice." Pharmacoepidemiol Drug Saf **16**(11): 1227-1233.

Derocq, J. M., M. Segui, C. Poinot-Chazel, A. Minty, D. Caput, P. Ferrara and P. Casellas (1994). "Interleukin-13 stimulates interleukin-6 production by human keratinocytes. Similarity with interleukin-4." FEBS Lett **343**(1): 32-36.

Deslauriers, N., L. Cote, S. Montplaisir and L. de Repentigny (1997). "Oral carriage of *Candida albicans* in murine AIDS." Infect Immun **65**(2): 661-667.

Dias, A. P. and L. P. Samaranayake (1995). "Clinical, microbiological and ultrastructural features of angular cheilitis lesions in Southern Chinese." Oral Dis **1**(1): 43-48.

Dickie, P. (1996). "HIV type 1 Nef perturbs eye lens development in transgenic mice." AIDS Res Hum Retroviruses **12**(3): 177-189.

Dickie, P., J. Felser, M. Eckhaus, J. Bryant, J. Silver, N. Marinos and A. L. Notkins (1991). "HIV-associated nephropathy in transgenic mice expressing HIV-1 genes." Virology **185**(1): 109-119.

Dickie, P., F. Ramsdell, A. L. Notkins and S. Venkatesan (1993). "Spontaneous and inducible epidermal hyperplasia in transgenic mice expressing HIV-1 Nef." Virology **197**(1): 431-438.

- Doan, T. (2008). Immunology. Philadelphia, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Doss, M., M. R. White, T. Teclé and K. L. Hartshorn (2010). "Human defensins and LL-37 in mucosal immunity." J Leukoc Biol **87**(1): 79-92.
- Douglas, L. J. (2003). "Candida biofilms and their role in infection." Trends Microbiol **11**(1): 30-36.
- Doumas, S., A. Kolokotronis and P. Stefanopoulos (2005). "Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor." Infect Immun **73**(3): 1271-1274.
- Edgerton, M., S. E. Koshlukova, T. E. Lo, B. G. Chrzan, R. M. Straubinger and P. A. Raj (1998). "Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin 5-binding protein on Candida albicans." J Biol Chem **273**(32): 20438-20447.
- El Hed, A., A. Khaitan, L. Kozhaya, N. Manel, D. Daskalakis, W. Borkowsky, F. Valentine, D. R. Littman and D. Unutmaz (2010). "Susceptibility of human Th17 cells to human immunodeficiency virus and their perturbation during infection." J Infect Dis **201**(6): 843-854.
- Elhed, A. and D. Unutmaz (2010). "Th17 cells and HIV infection." Curr Opin HIV AIDS **5**(2): 146-150.
- Ernst, J. F. (2000). "Transcription factors in Candida albicans - environmental control of morphogenesis." Microbiology **146 (Pt 8)**: 1763-1774.
- Estes, J. D. (2013). "Pathobiology of HIV/SIV-associated changes in secondary lymphoid tissues." Immunol Rev **254**(1): 65-77.
- Eto, D., C. Lao, D. DiToro, B. Barnett, T. C. Escobar, R. Kageyama, I. Yusuf and S. Crotty (2011). "IL-21 and IL-6 are critical for different aspects of B cell immunity and redundantly induce optimal follicular helper CD4 T cell (T_{fh}) differentiation." PLoS One **6**(3): e17739.
- Eversole, L. R., K. T. Miyasaki and R. E. Christensen (1993). "Keratinocyte expression of calprotectin in oral inflammatory mucosal diseases." J Oral Pathol Med **22**(7): 303-307.
- Eyerich, K., S. Foerster, S. Rombold, H. P. Seidl, H. Behrendt, H. Hofmann, J. Ring and C. Traidl-Hoffmann (2008). "Patients with chronic mucocutaneous candidiasis exhibit reduced

production of Th17-associated cytokines IL-17 and IL-22." J Invest Dermatol **128**(11): 2640-2645.

Eyerich, S., K. Eyerich, A. Cavani and C. Schmidt-Weber (2010). "IL-17 and IL-22: siblings, not twins." Trends Immunol **31**(9): 354-361.

Eyerich, S., J. Wagener, V. Wenzel, C. Scarponi, D. Pennino, C. Albanesi, M. Schaller, H. Behrendt, J. Ring, C. B. Schmidt-Weber, A. Cavani, M. Mempel, C. Traidl-Hoffmann and K. Eyerich (2011). "IL-22 and TNF-alpha represent a key cytokine combination for epidermal integrity during infection with *Candida albicans*." Eur J Immunol **41**(7): 1894-1901.

Fan, J., N. M. Heller, M. Gorospe, U. Atasoy and C. Stellato (2005). "The role of post-transcriptional regulation in chemokine gene expression in inflammation and allergy." Eur Respir J **26**(5): 933-947.

Fan, J., P. Nishanian, E. C. Breen, M. McDonald and J. L. Fahey (1998). "Cytokine gene expression in normal human lymphocytes in response to stimulation." Clin Diagn Lab Immunol **5**(3): 335-340.

Fanales-Belasio, E., M. Raimondo, B. Suligoj and S. Butto (2010). "HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview." Ann Ist Super Sanita **46**(1): 5-14.

Fanning, S. and A. P. Mitchell (2012). "Fungal biofilms." PLoS Pathog **8**(4): e1002585.

Farah, C. S., S. Elahi, K. Drysdale, G. Pang, T. Gotjamanos, G. J. Seymour, R. L. Clancy and R. B. Ashman (2002). "Primary role for CD4(+) T lymphocytes in recovery from oropharyngeal candidiasis." Infect Immun **70**(2): 724-731.

Farah, C. S., S. Elahi, G. Pang, T. Gotjamanos, G. J. Seymour, R. L. Clancy and R. B. Ashman (2001). "T cells augment monocyte and neutrophil function in host resistance against oropharyngeal candidiasis." Infect Immun **69**(10): 6110-6118.

Farah, C. S., S. Hong, S. Wanasaengsakul, S. Elahi, G. Pang, T. Gotjamanos, G. J. Seymour, R. L. Clancy and R. B. Ashman (2001). "Irradiation-induced oral candidiasis in an experimental murine model." Oral Microbiol Immunol **16**(6): 358-363.

- Farah, C. S., Y. Hu, S. Riminton and R. B. Ashman (2006). "Distinct roles for interleukin-12p40 and tumour necrosis factor in resistance to oral candidiasis defined by gene-targeting." Oral Microbiol Immunol **21**(4): 252-255.
- Federico, M., Z. Percario, E. Olivetta, G. Fiorucci, C. Muratori, A. Micheli, G. Romeo and E. Affabris (2001). "HIV-1 Nef activates STAT1 in human monocytes/macrophages through the release of soluble factors." Blood **98**(9): 2752-2761.
- Feller, L., R. A. Khammissa, R. Chandran, M. Altini and J. Lemmer (2013). "Oral candidosis in relation to oral immunity." J Oral Pathol Med.
- Fenoglio, D., A. Poggi, S. Catellani, F. Battaglia, A. Ferrera, M. Setti, G. Murdaca and M. R. Zocchi (2009). "Vdelta1 T lymphocytes producing IFN-gamma and IL-17 are expanded in HIV-1-infected patients and respond to Candida albicans." Blood **113**(26): 6611-6618.
- Ferrer, J. (2000). "Vaginal candidosis: epidemiological and etiological factors." Int J Gynaecol Obstet **71 Suppl 1**: S21-27.
- Fidel, P. L., Jr. (2002). "Immunity to Candida." Oral Dis **8 Suppl 2**: 69-75.
- Fidel, P. L., Jr. (2011). "Candida-host interactions in HIV disease: implications for oropharyngeal candidiasis." Adv Dent Res **23**(1): 45-49.
- Fiorentini, S., E. Riboldi, F. Facchetti, M. Avolio, M. Fabbri, G. Tosti, P. D. Becker, C. A. Guzman, S. Sozzani and A. Caruso (2008). "HIV-1 matrix protein p17 induces human plasmacytoid dendritic cells to acquire a migratory immature cell phenotype." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(10): 3867-3872.
- Fonzi, W. A. (1999). "PHR1 and PHR2 of Candida albicans encode putative glycosidases required for proper cross-linking of beta-1,3- and beta-1,6-glucans." J Bacteriol **181**(22): 7070-7079.
- Forsman, A. and R. A. Weiss (2008). "Why is HIV a pathogen?" Trends Microbiol **16**(12): 555-560.
- 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**(10): 4710-4718.

- Gaffen, S. L., N. Hernandez-Santos and A. C. Peterson (2011). "IL-17 signaling in host defense against *Candida albicans*." *Immunol Res* **50**(2-3): 181-187.
- Galask, R. P. (1988). "Vaginal colonization by bacteria and yeast." *Am J Obstet Gynecol* **158**(4): 993-995.
- Gallo, R. L., M. Murakami, T. Ohtake and M. Zaiou (2002). "Biology and clinical relevance of naturally occurring antimicrobial peptides." *J Allergy Clin Immunol* **110**(6): 823-831.
- Garcia, J. R., F. Jaumann, S. Schulz, A. Krause, J. Rodriguez-Jimenez, U. Forssmann, K. Adermann, E. Kluver, C. Vogelmeier, D. Becker, R. Hedrich, W. G. Forssmann and R. Bals (2001). "Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction." *Cell Tissue Res* **306**(2): 257-264.
- Garcia, J. R., A. Krause, S. Schulz, F. J. Rodriguez-Jimenez, E. Kluver, K. Adermann, U. Forssmann, A. Frimpong-Boateng, R. Bals and W. G. Forssmann (2001). "Human beta-defensin 4: a novel inducible peptide with a specific salt-sensitive spectrum of antimicrobial activity." *FASEB J* **15**(10): 1819-1821.
- Garg, A. and S. A. Spector (2013). "HIV Type 1 gp120-Induced Expansion of Myeloid Derived Suppressor Cells Is Dependent on Interleukin 6 and Suppresses Immunity." *J Infect Dis*.
- Gelderblom, H. R., M. Ozel and G. Pauli (1989). "Morphogenesis and morphology of HIV. Structure-function relations." *Arch Virol* **106**(1-2): 1-13.
- Ghannoum, M. A. (2000). "Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis." *Clin Microbiol Rev* **13**(1): 122-143, table of contents.
- Gladiator, A., N. Wangler, K. Trautwein-Weidner and S. LeibundGut-Landmann (2013). "Cutting edge: IL-17-secreting innate lymphoid cells are essential for host defense against fungal infection." *J Immunol* **190**(2): 521-525.
- Glocker, E. O. and B. Grimbacher (2011). "Mucosal antifungal defence: IL-17 signalling takes centre stage." *Immunol Cell Biol* **89**(8): 823-825.
- Goldsby, R. A. and R. A. Goldsby (2003). *Immunology*. New York, W.H. Freeman.

- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol **3**(1): 23-35.
- Gordon, S. and F. O. Martinez (2010). "Alternative activation of macrophages: mechanism and functions." Immunity **32**(5): 593-604.
- Gorry, P. R. and P. Ancuta (2011). "Coreceptors and HIV-1 pathogenesis." Curr HIV/AIDS Rep **8**(1): 45-53.
- Gosselin, A., P. Monteiro, N. Chomont, F. Diaz-Griffero, E. A. Said, S. Fonseca, V. Wacleche, M. El-Far, M. R. Boulassel, J. P. Routy, R. P. Sekaly and P. Ancuta (2010). "Peripheral blood CCR4+CCR6+ and CXCR3+CCR6+CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection." J Immunol **184**(3): 1604-1616.
- Goudsmit, J. (1997). Viral sex : the nature of AIDS. New York, Oxford University Press.
- Goupil, M., E. B. Trudelle, V. Dugas, C. Racicot-Bergeron, F. Aumont, S. Senechal, Z. Hanna, P. Jolicoeur and L. de Repentigny (2009). "Macrophage-mediated responses to *Candida albicans* in mice expressing the human immunodeficiency virus type 1 transgene." Infect Immun **77**(9): 4136-4149.
- Gow, N. A., F. L. van de Veerdonk, A. J. Brown and M. G. Netea (2012). "*Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization." Nat Rev Microbiol **10**(2): 112-122.
- Grone, A. (2002). "Keratinocytes and cytokines." Vet Immunol Immunopathol **88**(1-2): 1-12.
- Grutter, M. G., G. Fendrich, R. Huber and W. Bode (1988). "The 2.5 Å X-ray crystal structure of the acid-stable proteinase inhibitor from human mucous secretions analysed in its complex with bovine alpha-chymotrypsin." EMBO J **7**(2): 345-351.
- Hainer, B. L. and M. V. Gibson (2011). "Vaginitis." Am Fam Physician **83**(7): 807-815.
- Haley, K., B. Z. Igyarto, D. Ortner, A. Bobr, S. Kashem, D. Schenten and D. H. Kaplan (2012). "Langerhans cells require MyD88-dependent signals for *Candida albicans* response but not for contact hypersensitivity or migration." J Immunol **188**(9): 4334-4339.
- Hamad, M. (2014). "Estrogen treatment predisposes to severe and persistent vaginal candidiasis in diabetic mice." J Diabetes Metab Disord **13**(1): 15.

Hamann, J., N. Koning, W. Pouwels, L. H. Ulfman, M. van Eijk, M. Stacey, H. H. Lin, S. Gordon and M. J. Kwakkenbos (2007). "EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor." Eur J Immunol **37**(10): 2797-2802.

Hanna, Z., D. G. Kay, M. Cool, S. Jothy, N. Rebai and P. Jolicoeur (1998). "Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease." J Virol **72**(1): 121-132.

Hanna, Z., D. G. Kay, N. Rebai, A. Guimond, S. Jothy and P. Jolicoeur (1998). "Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice." Cell **95**(2): 163-175.

Hanna, Z., E. Priceputu, P. Chrobak, C. Hu, V. Dugas, M. Goupil, M. Marquis, L. de Repentigny and P. Jolicoeur (2009). "Selective expression of human immunodeficiency virus Nef in specific immune cell populations of transgenic mice is associated with distinct AIDS-like phenotypes." J Virol **83**(19): 9743-9758.

Hao, S. and D. Baltimore (2009). "The stability of mRNA influences the temporal order of the induction of genes encoding inflammatory molecules." Nat Immunol **10**(3): 281-288.

Harder, J., J. Bartels, E. Christophers and J. M. Schroder (1997). "A peptide antibiotic from human skin." Nature **387**(6636): 861.

Harper, E. G., C. Guo, H. Rizzo, J. V. Lillis, S. E. Kurtz, I. Skorcheva, D. Purdy, E. Fitch, M. Iordanov and A. Blauvelt (2009). "Th17 cytokines stimulate CCL20 expression in keratinocytes in vitro and in vivo: implications for psoriasis pathogenesis." J Invest Dermatol **129**(9): 2175-2183.

Harris, R. S., J. F. Hultquist and D. T. Evans (2012). "The restriction factors of human immunodeficiency virus." J Biol Chem **287**(49): 40875-40883.

He, H., Y. Cong, H. Yang and Y. Dong (2010). "Mutative expression in *Candida albicans* infection and cytokine signaling network in gene knockout mice." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **29**(8): 913-916.

He, Y., J. Li, Y. Zheng, Y. Luo, H. Zhou, Y. Yao, X. Chen, Z. Chen and M. He (2012). "A randomized case-control study of dynamic changes in peripheral blood Th17/Treg cell balance

and interleukin-17 levels in highly active antiretroviral-treated HIV type 1/AIDS patients." *AIDS Res Hum Retroviruses* **28**(4): 339-345.

Heit, B., G. Jones, D. Knight, J. M. Antony, M. J. Gill, C. Brown, C. Power and P. Kuberski (2006). "HIV and other lentiviral infections cause defects in neutrophil chemotaxis, recruitment, and cell structure: immunorestorative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." *J Immunol* **177**(9): 6405-6414.

Helmerhorst, E. J., R. F. Troxler and F. G. Oppenheim (2001). "The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(25): 14637-14642.

Herbein, G., G. Gras, K. A. Khan and W. Abbas (2010). "Macrophage signaling in HIV-1 infection." *Retrovirology* **7**: 34.

Hernandez-Santos, N. and S. L. Gaffen (2012). "Th17 cells in immunity to *Candida albicans*." *Cell Host Microbe* **11**(5): 425-435.

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**(5): 900-910.

Hernday, A. D., M. B. Lohse, P. M. Fordyce, C. J. Nobile, J. L. Derisi and A. D. Johnson (2013). "Structure of the transcriptional network controlling white-opaque switching in *Candida albicans*." *Mol Microbiol*.

Hickman, M. A., G. Zeng, A. Forche, M. P. Hiraoka, D. Abbey, B. D. Harrison, Y. M. Wang, C. H. Su, R. J. Bennett, Y. Wang and J. Berman (2013). "The 'obligate diploid' *Candida albicans* forms mating-competent haploids." *Nature* **494**(7435): 55-59.

Hittinger, G., C. Poggi, E. Delbeke, N. Profizi and A. Lefeuvre (1998). "Correlation between plasma levels of cytokines and HIV-1 RNA copy number in HIV-infected patients." *Infection* **26**(2): 100-103.

Hocini, H., P. Becquart, H. Bouhjalal, H. Adle-Biassette, M. D. Kazatchkine and L. Belec (2000). "Secretory leukocyte protease inhibitor inhibits infection of monocytes and lymphocytes with human immunodeficiency virus type 1 but does not interfere with

transcytosis of cell-associated virus across tight epithelial barriers." Clin Diagn Lab Immunol **7**(3): 515-518.

Hogan, K. A., A. Ravindran, M. A. Podolsky and A. B. Glick (2013). "The TGFbeta1 pathway is required for NFkappaB dependent gene expression in mouse keratinocytes." Cytokine.

Hogg, A. E., G. C. Bowick, N. K. Herzog, M. W. Cloyd and J. J. Endsley (2009). "Induction of granulysin in CD8+ T cells by IL-21 and IL-15 is suppressed by human immunodeficiency virus-1." J Leukoc Biol **86**(5): 1191-1203.

Hornby, J. M., E. C. Jensen, A. D. Lisee, J. J. Tasto, B. Jahnke, R. Shoemaker, P. Dussault and K. W. Nickerson (2001). "Quorum sensing in the dimorphic fungus *Candida albicans* is mediated by farnesol." Appl Environ Microbiol **67**(7): 2982-2992.

Hoyer, L. L. (2001). "The ALS gene family of *Candida albicans*." Trends Microbiol **9**(4): 176-180.

Hoyer, L. L. and J. E. Hecht (2000). "The ALS6 and ALS7 genes of *Candida albicans*." Yeast **16**(9): 847-855.

Hoyer, L. L. and J. E. Hecht (2001). "The ALS5 gene of *Candida albicans* and analysis of the Als5p N-terminal domain." Yeast **18**(1): 49-60.

Hoyer, L. L., T. L. Payne, M. Bell, A. M. Myers and S. Scherer (1998). "*Candida albicans* ALS3 and insights into the nature of the ALS gene family." Curr Genet **33**(6): 451-459.

Hoyer, L. L., T. L. Payne and J. E. Hecht (1998). "Identification of *Candida albicans* ALS2 and ALS4 and localization of als proteins to the fungal cell surface." J Bacteriol **180**(20): 5334-5343.

Hoyer, L. L., S. Scherer, A. R. Shatzman and G. P. Livi (1995). "*Candida albicans* ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif." Mol Microbiol **15**(1): 39-54.

Hromatka, B. S., S. M. Noble and A. D. Johnson (2005). "Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence." Mol Biol Cell **16**(10): 4814-4826.

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**(3): 624-631.

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**(1): 87-99.

Hube, B., F. Stehr, M. Bossenz, A. Mazur, M. Kretschmar and W. Schafer (2000). "Secreted lipases of Candida albicans: cloning, characterisation and expression analysis of a new gene family with at least ten members." Arch Microbiol **174**(5): 362-374.

Hull, C. M. and A. D. Johnson (1999). "Identification of a mating type-like locus in the asexual pathogenic yeast Candida albicans." Science **285**(5431): 1271-1275.

Hwang, C. S., G. E. Rhie, J. H. Oh, W. K. Huh, H. S. Yim and S. O. Kang (2002). "Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of Candida albicans against oxidative stresses and the expression of its full virulence." Microbiology **148**(Pt 11): 3705-3713.

Iannello, A., M. R. Boulassel, S. Samarani, O. Debeche, C. Tremblay, E. Toma, J. P. Routy and A. Ahmad (2010). "Dynamics and consequences of IL-21 production in HIV-infected individuals: a longitudinal and cross-sectional study." J Immunol **184**(1): 114-126.

Igyarto, B. Z., K. Haley, D. Ortner, A. Bobr, M. Gerami-Nejad, B. T. Edelson, S. M. Zurawski, B. Malissen, G. Zurawski, J. Berman and D. H. Kaplan (2011). "Skin-resident murine dendritic cell subsets promote distinct and opposing antigen-specific T helper cell responses." Immunity **35**(2): 260-272.

Ihalin, R., V. Loimaranta and J. Tenovuo (2006). "Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva." Arch Biochem Biophys **445**(2): 261-268.

Islam, S., N. Shimizu, S. A. Hoque, A. Jinno-Oue, A. Tanaka and H. Hoshino (2013). "CCR6 functions as a new coreceptor for limited primary human and simian immunodeficiency viruses." PLoS One **8**(8): e73116.

Ivanov, II, B. S. McKenzie, L. Zhou, C. E. Tadokoro, A. Lepelley, J. J. Lafaille, D. J. Cua and D. R. Littman (2006). "The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells." Cell **126**(6): 1121-1133.

Janeway, C. (2003). Immunobiologie : le système immunitaire fondamental et pathologique. Paris, De Boeck.

Jenabian, M. A., M. Patel, I. Kema, C. Kanagaratham, D. Radzioch, P. Thebault, R. Lapointe, C. Tremblay, N. Gilmore, P. Ancuta and J. P. Routy (2013). "Distinct Tryptophan Catabolism and Th17/Treg Balance in HIV Progressors and Elite Controllers." PLoS One **8**(10): e78146.

Ji, J. and M. W. Cloyd (2009). "HIV-1 binding to CD4 on CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells enhances their suppressive function and induces them to home to, and accumulate in, peripheral and mucosal lymphoid tissues: an additional mechanism of immunosuppression." Int Immunol **21**(3): 283-294.

Jia, H. P., S. A. Wowk, B. C. Schutte, S. K. Lee, A. Vivado, B. F. Tack, C. L. Bevins and P. B. McCray, Jr. (2000). "A novel murine beta -defensin expressed in tongue, esophagus, and trachea." J Biol Chem **275**(43): 33314-33320.

Joly, S., N. Ma, J. J. Sadler, D. R. Soll, S. L. Cassel and F. S. Sutterwala (2009). "Cutting edge: Candida albicans hyphae formation triggers activation of the Nlrp3 inflammasome." J Immunol **183**(6): 3578-3581.

Jones-Carson, J., A. Vazquez-Torres, T. Warner and E. Balish (2000). "Disparate requirement for T cells in resistance to mucosal and acute systemic candidiasis." Infect Immun **68**(4): 2363-2365.

Ju, S. M., A. R. Goh, D. J. Kwon, G. S. Youn, H. J. Kwon, Y. S. Bae, S. Y. Choi and J. Park (2012). "Extracellular HIV-1 Tat induces human beta-defensin-2 production via NF-kappaB/AP-1 dependent pathways in human B cells." Mol Cells **33**(4): 335-341.

Junqueira, J. C. (2012). "Models hosts for the study of oral candidiasis." Adv Exp Med Biol **710**: 95-105.

Kabir, M. A. and M. A. Hussain (2009). "Human fungal pathogen Candida albicans in the postgenomic era: an overview." Expert Rev Anti Infect Ther **7**(1): 121-134.

Kagami, S., H. L. Rizzo, S. E. Kurtz, L. S. Miller and A. Blauvelt (2010). "IL-23 and IL-17A, but not IL-12 and IL-22, are required for optimal skin host defense against *Candida albicans*." J Immunol **185**(9): 5453-5462.

Kamai, Y., M. Kubota, Y. Kamai, T. Hosokawa, T. Fukuoka and S. G. Filler (2001). "New model of oropharyngeal candidiasis in mice." Antimicrob Agents Chemother **45**(11): 3195-3197.

Kanda, N., S. Shibata, Y. Tada, K. Nashiro, K. Tamaki and S. Watanabe (2009). "Prolactin enhances basal and IL-17-induced CCL20 production by human keratinocytes." Eur J Immunol **39**(4): 996-1006.

Kao, C. Y., Y. Chen, P. Thai, S. Wachi, F. Huang, C. Kim, R. W. Harper and R. Wu (2004). "IL-17 markedly up-regulates beta-defensin-2 expression in human airway epithelium via JAK and NF-kappaB signaling pathways." J Immunol **173**(5): 3482-3491.

Kao, C. Y., F. Huang, Y. Chen, P. Thai, S. Wachi, C. Kim, L. Tam and R. Wu (2005). "Up-regulation of CC chemokine ligand 20 expression in human airway epithelium by IL-17 through a JAK-independent but MEK/NF-kappaB-dependent signaling pathway." J Immunol **175**(10): 6676-6685.

Kaplan, D. H., A. Kissenpfennig and B. E. Clausen (2008). "Insights into Langerhans cell function from Langerhans cell ablation models." Eur J Immunol **38**(9): 2369-2376.

Karsten, V., S. Gordon, A. Kirn and G. Herbein (1996). "HIV-1 envelope glycoprotein gp120 down-regulates CD4 expression in primary human macrophages through induction of endogenous tumour necrosis factor-alpha." Immunology **88**(1): 55-60.

Kavanagh, K. and S. Dowd (2004). "Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential." J Pharm Pharmacol **56**(3): 285-289.

Kennedy, A. D. and F. R. DeLeo (2009). "Neutrophil apoptosis and the resolution of infection." Immunol Res **43**(1-3): 25-61.

Khanna, K. V., X. F. Yu, D. H. Ford, L. Ratner, J. K. Hildreth and R. B. Markham (2000). "Differences among HIV-1 variants in their ability to elicit secretion of TNF-alpha." J Immunol **164**(3): 1408-1415.

- Kim, C. J., L. R. McKinnon, C. Kovacs, G. Kandel, S. Huibner, D. Chege, K. Shahabi, E. Benko, M. Loutfy, M. Ostrowski and R. Kaul (2013). "Mucosal Th17 cell function is altered during HIV infection and is an independent predictor of systemic immune activation." J Immunol **191**(5): 2164-2173.
- Kleinegger, C. L., D. C. Stoeckel and Z. B. Kurago (2001). "A comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **92**(1): 62-67.
- Klotman, P. E. and A. L. Notkins (1996). "Transgenic models of human immunodeficiency virus type-1." Curr Top Microbiol Immunol **206**: 197-222.
- Klotman, P. E., J. Rappaport, P. Ray, J. B. Kopp, R. Franks, L. A. Bruggeman and A. L. Notkins (1995). "Transgenic models of HIV-1." AIDS **9**(4): 313-324.
- Koelink, P. J., S. A. Overbeek, S. Braber, P. de Kruijf, G. Folkerts, M. J. Smit and A. D. Kraneveld (2012). "Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: an extensive review." Pharmacol Ther **133**(1): 1-18.
- Kohler, J. J., D. L. Tuttle, C. R. Coberley, J. W. Sleasman and M. M. Goodenow (2003). "Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) induces activation of multiple STATs in CD4+ cells of lymphocyte or monocyte/macrophage lineages." J Leukoc Biol **73**(3): 407-416.
- Komine, M., L. S. Rao, I. M. Freedberg, M. Simon, V. Milisavljevic and M. Blumenberg (2001). "Interleukin-1 induces transcription of keratin K6 in human epidermal keratinocytes." J Invest Dermatol **116**(2): 330-338.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.
- Kuipers, M. E., H. G. de Vries, M. C. Eikelboom, D. K. Meijer and P. J. Swart (1999). "Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical Candida isolates." Antimicrob Agents Chemother **43**(11): 2635-2641.
- Kullberg, B. J., M. G. Netea, A. G. Vonk and J. W. van der Meer (1999). "Modulation of neutrophil function in host defense against disseminated Candida albicans infection in mice." FEMS Immunol Med Microbiol **26**(3-4): 299-307.

- Kumamoto, C. A. and M. D. Vences (2005). "Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces." *Annu Rev Microbiol* **59**: 113-133.
- Lacasse, M., C. Fortier, J. Chakir, L. Cote and N. Deslauriers (1993). "Acquired resistance and persistence of *Candida albicans* following oral candidiasis in the mouse: a model of the carrier state in humans." *Oral Microbiol Immunol* **8**(5): 313-318.
- Lacasse, M., C. Fortier, L. Trudel, A. J. Collet and N. Deslauriers (1990). "Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects." *J Oral Pathol Med* **19**(3): 136-141.
- LaFleur, M. D., C. A. Kumamoto and K. Lewis (2006). "*Candida albicans* biofilms produce antifungal-tolerant persister cells." *Antimicrob Agents Chemother* **50**(11): 3839-3846.
- Landi, A., V. Iannucci, A. V. Nuffel, P. Meuwissen and B. Verhasselt (2011). "One protein to rule them all: modulation of cell surface receptors and molecules by HIV Nef." *Curr HIV Res* **9**(7): 496-504.
- Leghmari, K., X. Contreras, C. Moureau and E. Bahraoui (2008). "HIV-1 Tat protein induces TNF-alpha and IL-10 production by human macrophages: differential implication of PKC-betaII and -delta isozymes and MAP kinases ERK1/2 and p38." *Cell Immunol* **254**(1): 46-55.
- Leidich, S. D., A. S. Ibrahim, Y. Fu, A. Koul, C. Jessup, J. Vitullo, W. Fonzi, F. Mirbod, S. Nakashima, Y. Nozawa and M. A. Ghannoum (1998). "Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*." *J Biol Chem* **273**(40): 26078-26086.
- Lewandowski, D., M. Marquis, F. Aumont, A. C. Lussier-Morin, M. Raymond, S. Senechal, Z. Hanna, P. Jolicoeur and L. de Repentigny (2006). "Altered CD4+ T cell phenotype and function determine the susceptibility to mucosal candidiasis in transgenic mice expressing HIV-1." *J Immunol* **177**(1): 479-491.
- Li, H. and R. K. Reeves (2012). "Functional perturbation of classical natural killer and innate lymphoid cells in the oral mucosa during SIV infection." *Front Immunol* **3**: 417.

- Li, J. C., D. C. Lee, B. K. Cheung and A. S. Lau (2005). "Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response." FEBS Lett **579**(14): 3055-3062.
- Li, M., Q. Chen, R. Tang, Y. Shen and W. D. Liu (2011). "The expression of beta-defensin-2, 3 and LL-37 induced by *Candida albicans* phospholipomannan in human keratinocytes." J Dermatol Sci **61**(1): 72-75.
- Liang, S. C., X. Y. Tan, D. P. Luxenberg, R. Karim, K. Dunussi-Joannopoulos, M. Collins and L. A. Fouser (2006). "Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides." J Exp Med **203**(10): 2271-2279.
- Lin, A. L., D. A. Johnson, T. F. Patterson, Y. Wu, D. L. Lu, Q. Shi and C. K. Yeh (2001). "Salivary anticandidal activity and saliva composition in an HIV-infected cohort." Oral Microbiol Immunol **16**(5): 270-278.
- Liu, Y., B. Yang, M. Zhou, L. Li, H. Zhou, J. Zhang, H. Chen and C. Wu (2009). "Memory IL-22-producing CD4+ T cells specific for *Candida albicans* are present in humans." Eur J Immunol **39**(6): 1472-1479.
- Lopez-De-Blanc, S. A., N. Salati-De-Mugnolo, F. L. Femopase, M. B. Benitez, R. A. Morelato, L. Astrada-De-Verde and D. Masih (2002). "Antifungal topical therapy in oral chronic candidosis. A comparative study." Med Oral **7**(4): 260-270.
- Lopez-Garcia, B., P. H. Lee, K. Yamasaki and R. L. Gallo (2005). "Anti-fungal activity of cathelicidins and their potential role in *Candida albicans* skin infection." J Invest Dermatol **125**(1): 108-115.
- Lucas, S. B., A. Hounnou, C. Peacock, A. Beaumel, G. Djomand, J. M. N'Gbichi, K. Yeboue, M. Honde, M. Diomande, C. Giordano and et al. (1993). "The mortality and pathology of HIV infection in a west African city." AIDS **7**(12): 1569-1579.
- Luger, D., P. B. Silver, J. Tang, D. Cua, Z. Chen, Y. Iwakura, E. P. Bowman, N. M. Sgambellone, C. C. Chan and R. R. Caspi (2008). "Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category." J Exp Med **205**(4): 799-810.

Luna, L. G. (1992). Histopathologic methods and color atlas of special stains and tissue artifacts. Gaithersburg, MD, American Histolabs.

Lupetti, A., A. Paulusma-Annema, M. M. Welling, S. Senesi, J. T. van Dissel and P. H. Nibbering (2000). "Candidacidal activities of human lactoferrin peptides derived from the N terminus." Antimicrob Agents Chemother **44**(12): 3257-3263.

Ma, C. S., E. K. Deenick, M. Batten and S. G. Tangye (2012). "The origins, function, and regulation of T follicular helper cells." J Exp Med **209**(7): 1241-1253.

Maek, A. N. W., S. Buranapraditkun, J. Klaewsongkram and K. Ruxrungtham (2007). "Increased interleukin-17 production both in helper T cell subset Th17 and CD4-negative T cells in human immunodeficiency virus infection." Viral Immunol **20**(1): 66-75.

Manches, O., D. Munn, A. Fallahi, J. Lifson, L. Chaperot, J. Plumas and N. Bhardwaj (2008). "HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism." J Clin Invest **118**(10): 3431-3439.

Mangency, M., A. Fischer, F. Le Deist, J. P. Latge and A. Durandy (1989). "Direct activation of human B lymphocytes by *Candida albicans*-derived mannan antigen." Cell Immunol **122**(2): 329-337.

Mantovani, A., S. K. Biswas, M. R. Galdiero, A. Sica and M. Locati (2013). "Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling." J Pathol **229**(2): 176-185.

Mantovani, A., A. Sica, S. Sozzani, P. Allavena, A. Vecchi and M. Locati (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-686.

Mardon, D., E. Balish and A. W. Phillips (1969). "Control of dimorphism in a biochemical variant of *Candida albicans*." J Bacteriol **100**(2): 701-707.

Marquis, M., D. Lewandowski, V. Dugas, F. Aumont, S. Senechal, P. Jolicoeur, Z. Hanna and L. de Repentigny (2006). "CD8+ T cells but not polymorphonuclear leukocytes are required to limit chronic oral carriage of *Candida albicans* in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1." Infect Immun **74**(4): 2382-2391.

- Martchenko, M., A. M. Alarco, D. H Marcus and M. Whiteway (2004). "Superoxide dismutases in *Candida albicans*: transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene." Mol Biol Cell **15**(2): 456-467.
- Martinez, F. O., L. Helming and S. Gordon (2009). "Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective." Annu Rev Immunol **27**: 451-483.
- Masschalck, B. and C. W. Michiels (2003). "Antimicrobial properties of lysozyme in relation to foodborne vegetative bacteria." Crit Rev Microbiol **29**(3): 191-214.
- 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**(11): 1007-1014.
- Max, B. and R. Sherer (2000). "Management of the adverse effects of antiretroviral therapy and medication adherence." Clin Infect Dis **30 Suppl 2**: S96-116.
- Mayer, F. L., D. Wilson and B. Hube (2013). "*Candida albicans* pathogenicity mechanisms." Virulence **4**(2): 119-128.
- McCormick, T. S. and A. Weinberg (2010). "Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity." Periodontol 2000 **54**(1): 195-206.
- McGeachy, M. J. and S. J. McSorley (2012). "Microbial-induced Th17: superhero or supervillain?" J Immunol **189**(7): 3285-3291.
- McNeely, T. B., M. Dealy, D. J. Dripps, J. M. Orenstein, S. P. Eisenberg and S. M. Wahl (1995). "Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro." J Clin Invest **96**(1): 456-464.
- Mehra, T., M. Koberle, C. Braunsdorf, D. Mailander-Sanchez, C. Borelli and M. Schaller (2012). "Alternative approaches to antifungal therapies." Exp Dermatol **21**(10): 778-782.
- Melkoumov, A., M. Goupil, F. Louhichi, M. Raymond, L. de Repentigny and G. Leclair (2013). "Nystatin nanosizing enhances in vitro and in vivo antifungal activity against *Candida albicans*." J Antimicrob Chemother **68**(9): 2099-2105.

Mellors, J. W., L. A. Kingsley, C. R. Rinaldo, Jr., J. A. Todd, B. S. Hoo, R. P. Kokka and P. Gupta (1995). "Quantitation of HIV-1 RNA in plasma predicts outcome after seroconversion." Ann Intern Med **122**(8): 573-579.

Merad, M., M. G. Manz, H. Karsunky, A. Wagers, W. Peters, I. Charo, I. L. Weissman, J. G. Cyster and E. G. Engleman (2002). "Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions." Nat Immunol **3**(12): 1135-1141.

Merson-Davies, L. A. and F. C. Odds (1989). "A morphology index for characterization of cell shape in *Candida albicans*." J Gen Microbiol **135**(11): 3143-3152.

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**(3): 293-302.

Minagawa, K., K. Wakahashi, H. Kawano, S. Nishikawa, C. Fukui, Y. Kawano, N. Asada, M. Sato, A. Sada, Y. Katayama and T. Matsui (2014). "Posttranscriptional modulation of cytokine production in T cells for the regulation of excessive inflammation by TFL." J Immunol **192**(4): 1512-1524.

Monod, M., G. Togni, B. Hube and D. Sanglard (1994). "Multiplicity of genes encoding secreted aspartic proteinases in *Candida* species." Mol Microbiol **13**(2): 357-368.

Montagnoli, C., A. Bacci, S. Bozza, R. Gaziano, P. Mosci, A. H. Sharpe and L. Romani (2002). "B7/CD28-dependent CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*." J Immunol **169**(11): 6298-6308.

Montazeri, M. and H. G. Hedrick (1984). "Factors affecting spore formation in a *Candida albicans* strain." Appl Environ Microbiol **47**(6): 1341-1342.

Monteiro, P., A. Gosselin, V. S. Wacleche, M. El-Far, E. A. Said, H. Kared, N. Grandvaux, M. R. Boulassel, J. P. Routy and P. Ancuta (2011). "Memory CCR6⁺CD4⁺ T cells are preferential targets for productive HIV type 1 infection regardless of their expression of integrin beta7." J Immunol **186**(8): 4618-4630.

- Moore, D. A., T. Benepal, S. Portsmouth, J. Gill and B. G. Gazzard (2001). "Etiology and natural history of neutropenia in human immunodeficiency virus disease: a prospective study." Clin Infect Dis **32**(3): 469-475.
- Moreno-Fernandez, M. E., P. Presicce and C. A. Chougnet (2012). "Homeostasis and function of regulatory T cells in HIV/SIV infection." J Virol **86**(19): 10262-10269.
- Moreno-Ruiz, E., M. Galan-Diez, W. Zhu, E. Fernandez-Ruiz, C. d'Enfert, S. G. Filler, P. Cossart and E. Veiga (2009). "Candida albicans internalization by host cells is mediated by a clathrin-dependent mechanism." Cell Microbiol **11**(8): 1179-1189.
- Moriguchi, K., K. Miyamoto, N. Tanaka, O. Yoshie and S. Kusunoki (2013). "The importance of CCR4 and CCR6 in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol **257**(1-2): 53-58.
- Morrison, G. M., D. J. Davidson and J. R. Dorin (1999). "A novel mouse beta defensin, Defb2, which is upregulated in the airways by lipopolysaccharide." FEBS Lett **442**(1): 112-116.
- Mosser, D. M. (2003). "The many faces of macrophage activation." J Leukoc Biol **73**(2): 209-212.
- Moyes, D. L., C. Murciano, M. Runglall, A. Islam, S. Thavaraj and J. R. Naglik (2011). "Candida albicans yeast and hyphae are discriminated by MAPK signaling in vaginal epithelial cells." PLoS One **6**(11): e26580.
- Mukherjee, P. K., K. R. Seshan, S. D. Leidich, J. Chandra, G. T. Cole and M. A. Ghannoum (2001). "Reintroduction of the PLB1 gene into Candida albicans restores virulence in vivo." Microbiology **147**(Pt 9): 2585-2597.
- Munder, M., M. Mallo, K. Eichmann and M. Modolell (1998). "Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation." J Exp Med **187**(12): 2103-2108.
- Murciano, C., D. L. Moyes, M. Runglall, P. Tobouti, A. Islam, L. L. Hoyer and J. R. Naglik (2012). "Evaluation of the role of Candida albicans agglutinin-like sequence (Als) proteins in human oral epithelial cell interactions." PLoS One **7**(3): e33362.

- Murciano, C., E. Villamon, J. E. O'Connor, D. Gozalbo and M. L. Gil (2006). "Killed *Candida albicans* yeasts and hyphae inhibit gamma interferon release by murine natural killer cells." *Infect Immun* **74**(2): 1403-1406.
- Murthy, A. R., R. I. Lehrer, S. S. Harwig and K. T. Miyasaki (1993). "In vitro candidastatic properties of the human neutrophil calprotectin complex." *J Immunol* **151**(11): 6291-6301.
- Naglik, J., A. Albrecht, O. Bader and B. Hube (2004). "Candida albicans proteinases and host/pathogen interactions." *Cell Microbiol* **6**(10): 915-926.
- Naglik, J. R., S. J. Challacombe and B. Hube (2003). "Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis." *Microbiol Mol Biol Rev* **67**(3): 400-428, table of contents.
- Naglik, J. R., P. L. Fidel, Jr. and F. C. Odds (2008). "Animal models of mucosal Candida infection." *FEMS Microbiol Lett* **283**(2): 129-139.
- Naglik, J. R., D. L. Moyes, B. Wachtler and B. Hube (2011). "Candida albicans interactions with epithelial cells and mucosal immunity." *Microbes Infect* **13**(12-13): 963-976.
- Naglik, J. R., G. Newport, T. C. White, L. L. Fernandes-Naglik, J. S. Greenspan, D. Greenspan, S. P. Sweet, S. J. Challacombe and N. Agabian (1999). "In vivo analysis of secreted aspartyl proteinase expression in human oral candidiasis." *Infect Immun* **67**(5): 2482-2490.
- Nakae, S., Y. Iwakura, H. Suto and S. J. Galli (2007). "Phenotypic differences between Th1 and Th17 cells and negative regulation of Th1 cell differentiation by IL-17." *J Leukoc Biol* **81**(5): 1258-1268.
- Nakahama, T., H. Hanieh, N. T. Nguyen, I. Chinen, B. Ripley, D. Millrine, S. Lee, K. K. Nyati, P. K. Dubey, K. Chowdhury, Y. Kawahara and T. Kishimoto (2013). "Aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the microRNA-132/212 cluster promotes interleukin-17-producing T-helper cell differentiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**(29): 11964-11969.
- Nanci, A. and A. R. Ten Cate (2003). Ten Cate's oral histology : development, structure, and function. St. Louis, Mosby.

- Nantel, A. (2006). "The long hard road to a completed *Candida albicans* genome." Fungal Genet Biol **43**(5): 311-315.
- 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**(1): 67-78.
- Netea, M. G., R. Suttmuller, C. Hermann, C. A. Van der Graaf, J. W. Van der Meer, J. H. van Krieken, T. Hartung, G. Adema and B. J. Kullberg (2004). "Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells." J Immunol **172**(6): 3712-3718.
- Nigam, P., S. Kwa, V. Velu and R. R. Amara (2011). "Loss of IL-17-producing CD8 T cells during late chronic stage of pathogenic simian immunodeficiency virus infection." J Immunol **186**(2): 745-753.
- Nikawa, H., L. P. Samaranayake, J. Tenovuo, K. M. Pang and T. Hamada (1993). "The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*." Arch Oral Biol **38**(12): 1057-1063.
- Nilsson, J., A. Boasso, P. A. Velilla, R. Zhang, M. Vaccari, G. Franchini, G. M. Shearer, J. Andersson and C. Chougnet (2006). "HIV-1-driven regulatory T-cell accumulation in lymphoid tissues is associated with disease progression in HIV/AIDS." Blood **108**(12): 3808-3817.
- Niyonsaba, F. and H. Ogawa (2005). "Protective roles of the skin against infection: implication of naturally occurring human antimicrobial agents beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme." J Dermatol Sci **40**(3): 157-168.
- Nobile, C. J., H. A. Schneider, J. E. Nett, D. C. Sheppard, S. G. Filler, D. R. Andes and A. P. Mitchell (2008). "Complementary adhesin function in *C. albicans* biofilm formation." Curr Biol **18**(14): 1017-1024.
- Noble, S. M. and A. D. Johnson (2007). "Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen." Annu Rev Genet **41**: 193-211.

- Nukui, T., R. Ehama, M. Sakaguchi, H. Sonegawa, C. Katagiri, T. Hibino and N. H. Huh (2008). "S100A8/A9, a key mediator for positive feedback growth stimulation of normal human keratinocytes." J Cell Biochem **104**(2): 453-464.
- Nurieva, R., X. O. Yang, G. Martinez, Y. Zhang, A. D. Panopoulos, L. Ma, K. Schluns, Q. Tian, S. S. Watowich, A. M. Jetten and C. Dong (2007). "Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells." Nature **448**(7152): 480-483.
- Odds, F. C. (1988). Candida and Candidosis. Second Edition. London, United Kingdom, Bailliere Tindall.
- Ohl, L., M. Mohaupt, N. Czeloth, G. Hintzen, Z. Kiafard, J. Zwirner, T. Blankenstein, G. Henning and R. Forster (2004). "CCR7 governs skin dendritic cell migration under inflammatory and steady-state conditions." Immunity **21**(2): 279-288.
- Olivetta, E., Z. Percario, G. Fiorucci, G. Mattia, I. Schiavoni, C. Dennis, J. Jager, M. Harris, G. Romeo, E. Affabris and M. Federico (2003). "HIV-1 Nef induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappa B activation." J Immunol **170**(4): 1716-1727.
- Pallikkuth, S., A. Parmigiani and S. Pahwa (2012). "The role of interleukin-21 in HIV infection." Cytokine Growth Factor Rev **23**(4-5): 173-180.
- Pandiyan, P., H. R. Conti, L. Zheng, A. C. Peterson, D. R. Mathern, N. Hernandez-Santos, M. Edgerton, S. L. Gaffen and M. J. Lenardo (2011). "CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells promote Th17 cells in vitro and enhance host resistance in mouse *Candida albicans* Th17 cell infection model." Immunity **34**(3): 422-434.
- Pappas, P. G. (2006). "Invasive candidiasis." Infect Dis Clin North Am **20**(3): 485-506.
- Pappas, P. G., C. A. Kauffman, D. Andes, D. K. Benjamin, Jr., T. F. Calandra, J. E. Edwards, Jr., S. G. Filler, J. F. Fisher, B. J. Kullberg, L. Ostrosky-Zeichner, A. C. Reboli, J. H. Rex, T. J. Walsh, J. D. Sobel and A. Infectious Diseases Society of (2009). "Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America." Clin Infect Dis **48**(5): 503-535.

- Pelletier, M., L. Maggi, A. Micheletti, E. Lazzeri, N. Tamassia, C. Costantini, L. Cosmi, C. Lunardi, F. Annunziato, S. Romagnani and M. A. Cassatella (2010). "Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells." Blood **115**(2): 335-343.
- Peng, Q., H. Wang, H. Wang, X. Li, X. Lu, L. Liu, B. Zhou and Z. Chen (2013). "Imbalances of gut-homing CD4+ T-cell subsets in HIV-1-infected Chinese patients." J Acquir Immune Defic Syndr **64**(1): 25-31.
- Percario, Z., E. Olivetta, G. Fiorucci, G. Mangino, S. Peretti, G. Romeo, E. Affabris and M. Federico (2003). "Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef activates STAT3 in primary human monocyte/macrophages through the release of soluble factors: involvement of Nef domains interacting with the cell endocytotic machinery." J Leukoc Biol **74**(5): 821-832.
- Perlroth, J., B. Choi and B. Spellberg (2007). "Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment." Med Mycol **45**(4): 321-346.
- Pfaller, M. A. and D. J. Diekema (2010). "Epidemiology of invasive mycoses in North America." Crit Rev Microbiol **36**(1): 1-53.
- Pfaller, M. A., D. J. Diekema, D. L. Gibbs, V. A. Newell, J. F. Meis, I. M. Gould, W. Fu, A. L. Colombo, E. Rodriguez-Noriega and S. Global Antifungal Surveillance (2007). "Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance study, 1997 to 2005: an 8.5-year analysis of susceptibilities of *Candida* species and other yeast species to fluconazole and voriconazole determined by CLSI standardized disk diffusion testing." J Clin Microbiol **45**(6): 1735-1745.
- Phan, Q. T., C. L. Myers, Y. Fu, D. C. Sheppard, M. R. Yeaman, W. H. Welch, A. S. Ibrahim, J. E. Edwards, Jr. and S. G. Filler (2007). "Als3 is a *Candida albicans* invasin that binds to cadherins and induces endocytosis by host cells." PLoS Biol **5**(3): e64.
- Piot, P. and T. C. Quinn (2013). "Response to the AIDS pandemic--a global health model." N Engl J Med **368**(23): 2210-2218.
- Pirofski, L. A. and A. Casadevall (2009). "Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis." J Exp Med **206**(2): 269-273.

Pivarcsi, A., L. Bodai, B. Rethi, A. Kenderessy-Szabo, A. Koreck, M. Szell, Z. Beer, Z. Bata-Csorgoo, M. Magocsi, E. Rajnavolgyi, A. Dobozy and L. Kemeny (2003). "Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes." Int Immunol **15**(6): 721-730.

Pivarcsi, A., L. Kemeny and A. Dobozy (2004). "Innate immune functions of the keratinocytes. A review." Acta Microbiol Immunol Hung **51**(3): 303-310.

Pla, M. and G. Mahouy (1991). "The SCID mouse." Nouv Rev Fr Hematol **33**(6): 489-491.

Planes, R. and E. Bahraoui (2013). "HIV-1 Tat Protein Induces the Production of IDO in Human Monocyte Derived-Dendritic Cells through a Direct Mechanism: Effect on T Cells Proliferation." PLoS One **8**(9): e74551.

Polyak, S., H. Chen, D. Hirsch, I. George, R. Hershberg and K. Sperber (1997). "Impaired class II expression and antigen uptake in monocytic cells after HIV-1 infection." J Immunol **159**(5): 2177-2188.

Poudrier, J., X. Weng, D. G. Kay, Z. Hanna and P. Jolicoeur (2003). "The AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with accumulation of immature CD11bHi dendritic cells." J Virol **77**(21): 11733-11744.

Prendergast, A., J. G. Prado, Y. H. Kang, F. Chen, L. A. Riddell, G. Luzzi, P. Goulder and P. Klenerman (2010). "HIV-1 infection is characterized by profound depletion of CD161+ Th17 cells and gradual decline in regulatory T cells." AIDS **24**(4): 491-502.

Priceputu, E., I. Rodrigue, P. Chrobak, J. Poudrier, T. W. Mak, Z. Hanna, C. Hu, D. G. Kay and P. Jolicoeur (2005). "The Nef-mediated AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with increased Fas/FasL expression on T cells and T-cell death but is not prevented in Fas-, FasL-, tumor necrosis factor receptor 1-, or interleukin-1beta-converting enzyme-deficient or Bcl2-expressing transgenic mice." J Virol **79**(10): 6377-6391.

Qiao, X., B. He, A. Chiu, D. M. Knowles, A. Chadburn and A. Cerutti (2006). "Human immunodeficiency virus 1 Nef suppresses CD40-dependent immunoglobulin class switching in bystander B cells." Nat Immunol **7**(3): 302-310.

Quesniaux, V. r., B. Ryffel and F. Di Padova (2013). IL-17, IL-22 and their producing cells : role in inflammation and autoimmunity.

Quintana, F. J., A. S. Basso, A. H. Iglesias, T. Korn, M. F. Farez, E. Bettelli, M. Caccamo, M. Oukka and H. L. Weiner (2008). "Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor." Nature **453**(7191): 65-71.

Rahman, D., M. Mistry, S. Thavaraj, S. J. Challacombe and J. R. Naglik (2007). "Murine model of concurrent oral and vaginal *Candida albicans* colonization to study epithelial host-pathogen interactions." Microbes Infect **9**(5): 615-622.

Raport, C. J., J. Gosling, V. L. Schweickart, P. W. Gray and I. F. Charo (1996). "Molecular cloning and functional characterization of a novel human CC chemokine receptor (CCR5) for RANTES, MIP-1beta, and MIP-1alpha." J Biol Chem **271**(29): 17161-17166.

Reuben, J. M., J. A. Turpin, B. N. Lee, M. Doyle, B. Gonik, R. Jacobson and W. T. Shearer (1996). "Induction of inflammatory cytokines in placental monocytes of gravaidae infected with the human immunodeficiency virus type 1." J Interferon Cytokine Res **16**(11): 963-971.

Ripeau, J. S., M. Fiorillo, F. Aumont, P. Belhumeur and L. de Repentigny (2002). "Evidence for differential expression of *Candida albicans* virulence genes during oral infection in intact and human immunodeficiency virus type 1-transgenic mice." J Infect Dis **185**(8): 1094-1102.

Rizzardi, G. P., W. Barcellini, G. Tambussi, F. Lillo, M. Malnati, L. Perrin and A. Lazzarin (1996). "Plasma levels of soluble CD30, tumour necrosis factor (TNF)-alpha and TNF receptors during primary HIV-1 infection: correlation with HIV-1 RNA and the clinical outcome." AIDS **10**(13): F45-50.

Robbins, N., P. Uppuluri, J. Nett, R. Rajendran, G. Ramage, J. L. Lopez-Ribot, D. Andes and L. E. Cowen (2011). "Hsp90 governs dispersion and drug resistance of fungal biofilms." PLoS Pathog **7**(9): e1002257.

Roda, J. M., R. Parihar, C. Magro, G. J. Nuovo, S. Tridandapani and W. E. Carson, 3rd (2006). "Natural killer cells produce T cell-recruiting chemokines in response to antibody-coated tumor cells." Cancer Res **66**(1): 517-526.

- Roder, J. and A. Duwe (1979). "The beige mutation in the mouse selectively impairs natural killer cell function." Nature **278**(5703): 451-453.
- Rodriguez, B., D. A. Bazdar, N. Funderburg, R. Asaad, A. A. Luciano, G. Yadavalli, R. C. Kalayjian, M. M. Lederman and S. F. Sieg (2011). "Frequencies of FoxP3+ naive T cells are related to both viral load and naive T cell proliferation responses in HIV disease." J Leukoc Biol **90**(3): 621-628.
- Roederer, M., J. G. Dubs, M. T. Anderson, P. A. Raju, L. A. Herzenberg and L. A. Herzenberg (1995). "CD8 naive T cell counts decrease progressively in HIV-infected adults." J Clin Invest **95**(5): 2061-2066.
- Rogers, T. J. and E. Balish (1980). "Immunity to *Candida albicans*." Microbiol Rev **44**(4): 660-682.
- Rohrl, J., D. Yang, J. J. Oppenheim and T. Hehlhans (2010). "Human beta-defensin 2 and 3 and their mouse orthologs induce chemotaxis through interaction with CCR2." J Immunol **184**(12): 6688-6694.
- Romagnani, S., E. Maggi, F. Liotta, L. Cosmi and F. Annunziato (2009). "Properties and origin of human Th17 cells." Mol Immunol **47**(1): 3-7.
- Romani, L. (2008). "Cell mediated immunity to fungi: a reassessment." Med Mycol **46**(6): 515-529.
- Romani, L., T. Zelante, A. De Luca, F. Fallarino and P. Puccetti (2008). "IL-17 and therapeutic kynurenes in pathogenic inflammation to fungi." J Immunol **180**(8): 5157-5162.
- Romani, N., B. E. Clausen and P. Stoitzner (2010). "Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin." Immunol Rev **234**(1): 120-141.
- Rossi, D. L., S. D. Hurst, Y. Xu, W. Wang, S. Menon, R. L. Coffman and A. Zlotnik (1999). "Lungkine, a novel CXC chemokine, specifically expressed by lung bronchoepithelial cells." J Immunol **162**(9): 5490-5497.
- Rowe, J. H., J. M. Ertelt and S. S. Way (2012). "Foxp3(+) regulatory T cells, immune stimulation and host defence against infection." Immunology **136**(1): 1-10.

- Rueda, C. M., P. A. Velilla, C. A. Chougnat, C. J. Montoya and M. T. Rugeles (2012). "HIV-induced T-cell activation/exhaustion in rectal mucosa is controlled only partially by antiretroviral treatment." PLoS One **7**(1): e30307.
- Rustchenko-Bulgac, E. P., F. Sherman and J. B. Hicks (1990). "Chromosomal rearrangements associated with morphological mutants provide a means for genetic variation of *Candida albicans*." J Bacteriol **172**(3): 1276-1283.
- Rustchenko, E. (2007). "Chromosome instability in *Candida albicans*." FEMS Yeast Res **7**(1): 2-11.
- Saijo, S., S. Ikeda, K. Yamabe, S. Kakuta, H. Ishigame, A. Akitsu, N. Fujikado, T. Kusaka, S. Kubo, S. H. Chung, R. Komatsu, N. Miura, Y. Adachi, N. Ohno, K. Shibuya, N. Yamamoto, K. Kawakami, S. Yamasaki, T. Saito, S. Akira and Y. Iwakura (2010). "Dectin-2 recognition of alpha-mannans and induction of Th17 cell differentiation is essential for host defense against *Candida albicans*." Immunity **32**(5): 681-691.
- Saijo, S. and Y. Iwakura (2011). "Dectin-1 and Dectin-2 in innate immunity against fungi." Int Immunol **23**(8): 467-472.
- Sakaguchi, S., K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin and T. Yamaguchi (2009). "Regulatory T cells: how do they suppress immune responses?" Int Immunol **21**(10): 1105-1111.
- Sallusto, F., D. Lenig, R. Forster, M. Lipp and A. Lanzavecchia (1999). "Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions." Nature **401**(6754): 708-712.
- Samaranayake, L. P. (1991). "Superficial oral fungal infections." Curr Opin Dent **1**(4): 415-422.
- Samaranayake, L. P. and P. Holmstrup (1989). "Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection." J Oral Pathol Med **18**(10): 554-564.
- Samaranayake, L. P., W. Keung Leung and L. Jin (2009). "Oral mucosal fungal infections." Periodontol 2000 **49**: 39-59.

Samaranayake, L. P. and T. W. MacFarlane (1990). Oral candidosis / edited by Lakshman P. Samaranayake, T. Wallace MacFarlane ; with a foreword by Jen J. Pindborg. London ; Boston, Wright.

Samaranayake, Y. H., B. P. Cheung, N. Parahitiyawa, C. J. Seneviratne, J. Y. Yau, K. W. Yeung and L. P. Samaranayake (2009). "Synergistic activity of lysozyme and antifungal agents against *Candida albicans* biofilms on denture acrylic surfaces." Arch Oral Biol **54**(2): 115-126.

Samaranayake, Y. H. and L. P. Samaranayake (2001). "Experimental oral candidiasis in animal models." Clin Microbiol Rev **14**(2): 398-429.

Sanchez-Guajardo, V., C. Tanchot, J. T. O'Malley, M. H. Kaplan, S. Garcia and A. A. Freitas (2007). "Agonist-driven development of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells requires a second signal mediated by Stat6." J Immunol **178**(12): 7550-7556.

Sarafianos, S. G., B. Marchand, K. Das, D. M. Himmel, M. A. Parniak, S. H. Hughes and E. Arnold (2009). "Structure and function of HIV-1 reverse transcriptase: molecular mechanisms of polymerization and inhibition." J Mol Biol **385**(3): 693-713.

Saville, S. P., A. L. Lazzell, C. Monteagudo and J. L. Lopez-Ribot (2003). "Engineered control of cell morphology in vivo reveals distinct roles for yeast and filamentous forms of *Candida albicans* during infection." Eukaryot Cell **2**(5): 1053-1060.

Schaller, M., C. Borelli, H. C. Korting and B. Hube (2005). "Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*." Mycoses **48**(6): 365-377.

Scherpereel, A., B. D. Grigoriu, M. Noppen, T. Gey, B. Chahine, S. Baldacci, J. Trauet, M. C. Copin, J. P. Dessaint, H. Porte and M. Labalette (2013). "Defect in recruiting effector memory CD8+ T-cells in malignant pleural effusions compared to normal pleural fluid." BMC Cancer **13**: 324.

Schmitz, J. M., V. J. McCracken, R. A. Dimmitt and R. G. Lorenz (2007). "Expression of CXCL15 (Lungkine) in murine gastrointestinal, urogenital, and endocrine organs." J Histochem Cytochem **55**(5): 515-524.

Schnapp, D., C. J. Reid and A. Harris (1998). "Localization of expression of human beta defensin-1 in the pancreas and kidney." J Pathol **186**(1): 99-103.

Schofield, D. A., C. Westwater and E. Balish (2004). "beta-defensin expression in immunocompetent and immunodeficient germ-free and *Candida albicans*-monoassociated mice." J Infect Dis **190**(7): 1327-1334.

Schulze Zur Wiesch, J., A. Thomssen, P. Hartjen, I. Toth, C. Lehmann, D. Meyer-Olson, K. Colberg, S. Frerk, D. Babikir, S. Schmiedel, O. Degen, S. Mauss, J. Rockstroh, S. Staszewski, P. Khaykin, A. Strasak, A. W. Lohse, G. Fatkenheuer, J. Hauber and J. van Lunzen (2011). "Comprehensive analysis of frequency and phenotype of T regulatory cells in HIV infection: CD39 expression of FoxP3+ T regulatory cells correlates with progressive disease." J Virol **85**(3): 1287-1297.

Schuman, P., J. D. Sobel, S. E. Ohmit, K. H. Mayer, C. C. Carpenter, A. Rompalo, A. Duerr, D. K. Smith, D. Warren and R. S. Klein (1998). "Mucosal candidal colonization and candidiasis in women with or at risk for human immunodeficiency virus infection. HIV Epidemiology Research Study (HERS) Group." Clin Infect Dis **27**(5): 1161-1167.

Schwartz, Y. and A. V. Svistelnik (2012). "Functional phenotypes of macrophages and the M1-M2 polarization concept. Part I. Proinflammatory phenotype." Biochemistry (Mosc) **77**(3): 246-260.

Semple, C. A., P. Gautier, K. Taylor and J. R. Dorin (2006). "The changing of the guard: Molecular diversity and rapid evolution of beta-defensins." Mol Divers **10**(4): 575-584.

Shapiro, R. S., P. Uppuluri, A. K. Zaas, C. Collins, H. Senn, J. R. Perfect, J. Heitman and L. E. Cowen (2009). "Hsp90 orchestrates temperature-dependent *Candida albicans* morphogenesis via Ras1-PKA signaling." Curr Biol **19**(8): 621-629.

Shin, H. C., N. Benbernou, S. Esnault and M. Guenounou (1999). "Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway." Cytokine **11**(4): 257-266.

Shine, N. R., S. C. Wang, K. Konopka, E. A. Burks, N. Duzgunes and C. P. Whitman (2002). "Secretory leukocyte protease inhibitor: inhibition of human immunodeficiency virus-1 infection of monocytic THP-1 cells by a newly cloned protein." Bioorg Chem **30**(4): 249-263.

Shugars, D. C., D. L. Sauls and J. B. Weinberg (1997). "Secretory leukocyte protease inhibitor blocks infectivity of primary monocytes and mononuclear cells with both monocytotropic and lymphocytotropic strains of human immunodeficiency virus type I." Oral Dis **3 Suppl 1**: S70-72.

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**(3): e1003210.

Sica, A. and A. Mantovani (2012). "Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas." J Clin Invest **122**(3): 787-795.

Sieg, S. F., D. A. Bazdar and M. M. Lederman (2003). "Impaired TCR-mediated induction of Ki67 by naive CD4+ T cells is only occasionally corrected by exogenous IL-2 in HIV-1 infection." J Immunol **171**(10): 5208-5214.

Simonetti, N., V. Strippoli and A. Cassone (1974). "Yeast-mycelial conversion induced by N-acetyl-D-glucosamine in Candida albicans." Nature **250**(464): 344-346.

Sinha, B. K., S. Prasad and D. P. Monga (1987). "Studies of the role of B-cells in the resistance of mice to experimental candidiasis." Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A **266**(1-2): 316-322.

Skott, P., E. Lucht, M. Ehnlund and E. Bjorling (2002). "Inhibitory function of secretory leukocyte proteinase inhibitor (SLPI) in human saliva is HIV-1 specific and varies with virus tropism." Oral Dis **8**(3): 160-167.

Slutsky, B., M. Staebell, J. Anderson, L. Risen, M. Pfaller and D. R. Soll (1987). ""White-opaque transition": a second high-frequency switching system in Candida albicans." J Bacteriol **169**(1): 189-197.

- Smith, D. G., G. J. Guillemin, L. Pemberton, S. Kerr, A. Nath, G. A. Smythe and B. J. Brew (2001). "Quinolinic acid is produced by macrophages stimulated by platelet activating factor, Nef and Tat." J Neurovirol **7**(1): 56-60.
- Smith, E., M. A. Stark, A. Zarbock, T. L. Burcin, A. C. Bruce, D. Vaswani, P. Foley and K. Ley (2008). "IL-17A inhibits the expansion of IL-17A-producing T cells in mice through "short-loop" inhibition via IL-17 receptor." J Immunol **181**(2): 1357-1364.
- Sonneborn, A., D. P. Bockmuhl and J. F. Ernst (1999). "Chlamyospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator." Infect Immun **67**(10): 5514-5517.
- Soukka, T., J. Tenovuo and M. Lenander-Lumikari (1992). "Fungicidal effect of human lactoferrin against *Candida albicans*." FEMS Microbiol Lett **69**(3): 223-228.
- Spritz, R. A. (1998). "Genetic defects in Chediak-Higashi syndrome and the beige mouse." J Clin Immunol **18**(2): 97-105.
- Sriram, K., S. Soliman and F. Fages (2009). "Dynamics of the interlocked positive feedback loops explaining the robust epigenetic switching in *Candida albicans*." J Theor Biol **258**(1): 71-88.
- 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**(5407): 1535-1538.
- Staib, P., M. Kretschmar, T. Nichterlein, H. Hof and J. Morschhauser (2000). "Differential activation of a *Candida albicans* virulence gene family during infection." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(11): 6102-6107.
- Stein, M., S. Keshav, N. Harris and S. Gordon (1992). "Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation." J Exp Med **176**(1): 287-292.
- Steinbach, W. J. and A. K. Zaas (2004). "Newer animal models of *Aspergillus* and *Candida* infections." Drug Discovery Today: Disease Models **1**(1): 87-93.

- Stevens, D. B., K. E. Gould and R. H. Swanborg (1994). "Transforming growth factor-beta 1 inhibits tumor necrosis factor-alpha/lymphotoxin production and adoptive transfer of disease by effector cells of autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol **51**(1): 77-83.
- Stoll, S., G. Muller, M. Kurimoto, J. Saloga, T. Tanimoto, H. Yamauchi, H. Okamura, J. Knop and A. H. Enk (1997). "Production of IL-18 (IFN-gamma-inducing factor) messenger RNA and functional protein by murine keratinocytes." J Immunol **159**(1): 298-302.
- Stout, R. D., C. Jiang, B. Matta, I. Tietzel, S. K. Watkins and J. Suttles (2005). "Macrophages sequentially change their functional phenotype in response to changes in microenvironmental influences." J Immunol **175**(1): 342-349.
- Strebel, K. (2003). "Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev." AIDS **17 Suppl 4**: S25-34.
- Sudbery, P., N. Gow and J. Berman (2004). "The distinct morphogenic states of *Candida albicans*." Trends Microbiol **12**(7): 317-324.
- Sudbery, P. E. (2011). "Growth of *Candida albicans* hyphae." Nat Rev Microbiol **9**(10): 737-748.
- Sun, J. N., N. V. Solis, Q. T. Phan, J. S. Bajwa, H. Kashleva, A. Thompson, Y. Liu, A. Dongari-Bagtzoglou, M. Edgerton and S. G. Filler (2010). "Host cell invasion and virulence mediated by *Candida albicans* Ssa1." PLoS Pathog **6**(11): e1001181.
- Sutmuller, R. P., M. H. den Brok, M. Kramer, E. J. Bennink, L. W. Toonen, B. J. Kullberg, L. A. Joosten, S. Akira, M. G. Netea and G. J. Adema (2006). "Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells." J Clin Invest **116**(2): 485-494.
- Suto, A., A. L. Wurster, S. L. Reiner and M. J. Grusby (2006). "IL-21 inhibits IFN-gamma production in developing Th1 cells through the repression of Eomesodermin expression." J Immunol **177**(6): 3721-3727.
- Sweet, S. P., A. N. Denbury and S. J. Challacombe (2001). "Salivary calprotectin levels are raised in patients with oral candidiasis or Sjogren's syndrome but decreased by HIV infection." Oral Microbiol Immunol **16**(2): 119-123.

Swingler, S., A. Mann, J. Jacque, B. Brichacek, V. G. Sasseville, K. Williams, A. A. Lackner, E. N. Janoff, R. Wang, D. Fisher and M. Stevenson (1999). "HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages." Nat Med **5**(9): 997-103.

Szafranski-Schneider, E., M. Swidergall, F. Cottier, D. Tielker, E. Roman, J. Pla and J. F. Ernst (2012). "Msb2 shedding protects *Candida albicans* against antimicrobial peptides." PLoS Pathog **8**(2): e1002501.

Szolnoky, G., Z. Bata-Csorgo, A. S. Kenderessy, M. Kiss, A. Pivarcsi, Z. Novak, K. Nagy Newman, G. Michel, T. Ruzicka, L. Marodi, A. Dobozy and L. Kemeny (2001). "A mannose-binding receptor is expressed on human keratinocytes and mediates killing of *Candida albicans*." J Invest Dermatol **117**(2): 205-213.

Takaki, H., K. Ichiyama, K. Koga, T. Chinen, G. Takaesu, Y. Sugiyama, S. Kato, A. Yoshimura and T. Kobayashi (2008). "STAT6 Inhibits TGF-beta1-mediated Foxp3 induction through direct binding to the Foxp3 promoter, which is reverted by retinoic acid receptor." J Biol Chem **283**(22): 14955-14962.

Takakura, N., Y. Sato, H. Ishibashi, H. Oshima, K. Uchida, H. Yamaguchi and S. Abe (2003). "A novel murine model of oral candidiasis with local symptoms characteristic of oral thrush." Microbiol Immunol **47**(5): 321-326.

Takakura, N., H. Wakabayashi, H. Ishibashi, S. Teraguchi, Y. Tamura, H. Yamaguchi and S. Abe (2003). "Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice." Antimicrob Agents Chemother **47**(8): 2619-2623.

Takakura, N., H. Wakabayashi, H. Ishibashi, K. Yamauchi, S. Teraguchi, Y. Tamura, H. Yamaguchi and S. Abe (2004). "Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model." J Med Microbiol **53**(Pt 6): 495-500.

Tanida, T., F. Rao, T. Hamada, E. Ueta and T. Osaki (2001). "Lactoferrin peptide increases the survival of *Candida albicans*-inoculated mice by upregulating neutrophil and macrophage functions, especially in combination with amphotericin B and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Infect Immun **69**(6): 3883-3890.

- Taoufik, Y., O. Lantz, C. Wallon, A. Charles, E. Dussaix and J. F. Delfraissy (1997). "Human immunodeficiency virus gp120 inhibits interleukin-12 secretion by human monocytes: an indirect interleukin-10-mediated effect." Blood **89**(8): 2842-2848.
- Taschdjian, C. L., J. J. Burchall and P. J. Kozinn (1960). "Rapid identification of *Candida albicans* by filamentation on serum and serum substitutes." AMA J Dis Child **99**: 212-215.
- Taylor, B. N., M. Saavedra and P. L. Fidel, Jr. (2000). "Local Th1/Th2 cytokine production during experimental vaginal candidiasis: potential importance of transforming growth factor-beta." Med Mycol **38**(6): 419-431.
- Theiss, S., G. Ishdorj, A. Brenot, M. Kretschmar, C. Y. Lan, T. Nichterlein, J. Hacker, S. Nigam, N. Agabian and G. A. Kohler (2006). "Inactivation of the phospholipase B gene PLB5 in wild-type *Candida albicans* reduces cell-associated phospholipase A2 activity and attenuates virulence." Int J Med Microbiol **296**(6): 405-420.
- Tian, T., S. Yu and D. Ma (2013). "Th22 and related cytokines in inflammatory and autoimmune diseases." Expert Opin Ther Targets **17**(2): 113-125.
- Tomee, J. F., P. S. Hiemstra, R. Heinzl-Wieland and H. F. Kauffman (1997). "Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi." J Infect Dis **176**(3): 740-747.
- Toth, K. G., B. R. McKay, M. De Lisio, J. P. Little, M. A. Tarnopolsky and G. Parise (2011). "IL-6 induced STAT3 signalling is associated with the proliferation of human muscle satellite cells following acute muscle damage." PLoS One **6**(3): e17392.
- Totti, M. A., E. B. dos Santos, O. P. de Almeida, C. Y. Koga-Ito and A. O. Jorge (2004). "Oral candidosis by *Candida albicans* in normal and xerostomic mice." Braz Oral Res **18**(3): 202-207.
- Trifari, S., C. D. Kaplan, E. H. Tran, N. K. Crellin and H. Spits (2009). "Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells." Nat Immunol **10**(8): 864-871.
- Trudel, L., L. St-Amand, M. Bareil, P. Cardinal and M. C. Lavoie (1986). "Bacteriology of the oral cavity of BALB/c mice." Can J Microbiol **32**(8): 673-678.

- van de Veerdonk, F. L., B. J. Kullberg, I. C. Verschueren, T. Hendriks, J. W. van der Meer, L. A. Joosten and M. G. Netea (2010). "Differential effects of IL-17 pathway in disseminated candidiasis and zymosan-induced multiple organ failure." Shock **34**(4): 407-411.
- van Loon, L. A., S. R. Krieg, C. L. Davidson and J. D. Bos (1989). "Quantification and distribution of lymphocyte subsets and Langerhans cells in normal human oral mucosa and skin." J Oral Pathol Med **18**(4): 197-201.
- Varin, A., S. K. Manna, V. Quivy, A. Z. Decrion, C. Van Lint, G. Herbein and B. B. Aggarwal (2003). "Exogenous Nef protein activates NF-kappa B, AP-1, and c-Jun N-terminal kinase and stimulates HIV transcription in promonocytic cells. Role in AIDS pathogenesis." J Biol Chem **278**(4): 2219-2227.
- Vasan, A., B. Renjifo, E. Hertzmark, B. Chaplin, G. Msamanga, M. Essex, W. Fawzi and D. Hunter (2006). "Different rates of disease progression of HIV type 1 infection in Tanzania based on infecting subtype." Clin Infect Dis **42**(6): 843-852.
- Vazquez-Torres, A. and E. Balish (1997). "Macrophages in resistance to candidiasis." Microbiol Mol Biol Rev **61**(2): 170-192.
- Vazquez, N., T. Greenwell-Wild, N. J. Marinos, W. D. Swaim, S. Nares, D. E. Ott, U. Schubert, P. Henklein, J. M. Orenstein, M. B. Sporn and S. M. Wahl (2005). "Human immunodeficiency virus type 1-induced macrophage gene expression includes the p21 gene, a target for viral regulation." J Virol **79**(7): 4479-4491.
- Vecchiarelli, A., C. Monari, B. Palazzetti, F. Bistoni and A. Casadevall (2000). "Dysregulation in IL-12 secretion by neutrophils from HIV-infected patients." Clin Exp Immunol **121**(2): 311-319.
- Verstrepen, K. J. and F. M. Klis (2006). "Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts." Mol Microbiol **60**(1): 5-15.
- Villarino, A. V., S. D. Katzman, E. Gallo, O. Miller, S. Jiang, M. T. McManus and A. K. Abbas (2011). "Posttranscriptional silencing of effector cytokine mRNA underlies the anergic phenotype of self-reactive T cells." Immunity **34**(1): 50-60.

Vogel, C. and E. M. Marcotte (2012). "Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses." Nat Rev Genet **13**(4): 227-232.

Vonk, A. G., M. G. Netea, J. W. van der Meer and B. J. Kullberg (2006). "Host defence against disseminated *Candida albicans* infection and implications for antifungal immunotherapy." Expert Opin Biol Ther **6**(9): 891-903.

Voo, K. S., Y. H. Wang, F. R. Santori, C. Boggiano, Y. H. Wang, K. Arima, L. Bover, S. Hanabuchi, J. Khalili, E. Marinova, B. Zheng, D. R. Littman and Y. J. Liu (2009). "Identification of IL-17-producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(12): 4793-4798.

Wachtler, B., D. Wilson, K. Haedicke, F. Dalle and B. Hube (2011). "From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells." PLoS One **6**(2): e17046.

Wacleche, V. S., N. Chomont, A. Gosselin, P. Monteiro, M. Goupil, H. Kared, C. Tremblay, N. Bernard, M. R. Boulassel, J. P. Routy and P. Ancuta (2012). "The colocalization potential of HIV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T-cells is mediated by integrin beta7 but not CCR6 and regulated by retinoic acid." PLoS One **7**(3): e32964.

Wagner, R. D., A. Vazquez-Torres, J. Jones-Carson, T. Warner and E. Balish (1996). "B cell knockout mice are resistant to mucosal and systemic candidiasis of endogenous origin but susceptible to experimental systemic candidiasis." J Infect Dis **174**(3): 589-597.

Waithman, J., R. S. Allan, H. Kosaka, H. Azukizawa, K. Shortman, M. B. Lutz, W. R. Heath, F. R. Carbone and G. T. Belz (2007). "Skin-derived dendritic cells can mediate deletional tolerance of class I-restricted self-reactive T cells." J Immunol **179**(7): 4535-4541.

Wakabayashi, H., N. Takakura, S. Teraguchi and Y. Tamura (2003). "Lactoferrin feeding augments peritoneal macrophage activities in mice intraperitoneally injected with inactivated *Candida albicans*." Microbiol Immunol **47**(1): 37-43.

Wang, H., W. Song, G. Huang, Z. Zhou, Y. Ding and J. Chen (2011). "*Candida albicans* Zcf37, a zinc finger protein, is required for stabilization of the white state." FEBS Lett **585**(5): 797-802.

- Warnakulasuriya, K. A., L. P. Samaranayake and J. S. Peiris (1991). "Angular cheilitis in a group of Sri Lankan adults: a clinical and microbiologic study." J Oral Pathol Med **20**(4): 172-175.
- Watts, H. J., A. A. Very, T. H. Perera, J. M. Davies and N. A. Gow (1998). "Thigmotropism and stretch-activated channels in the pathogenic fungus *Candida albicans*." Microbiology **144** (Pt 3): 689-695.
- Wei, L., A. Laurence, K. M. Elias and J. J. O'Shea (2007). "IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner." J Biol Chem **282**(48): 34605-34610.
- Weiss, R. A. (1993). "How does HIV cause AIDS?" Science **260**(5112): 1273-1279.
- Wery, S., M. Letourneur, J. Bertoglio and J. Pierre (1996). "Interleukin-4 induces activation of mitogen-activated protein kinase and phosphorylation of *src* in human keratinocytes." J Biol Chem **271**(15): 8529-8532.
- Whiteway, M. and C. Bachewich (2007). "Morphogenesis in *Candida albicans*." Annu Rev Microbiol **61**: 529-553.
- Whiteway, M. and U. Oberholzer (2004). "Candida morphogenesis and host-pathogen interactions." Curr Opin Microbiol **7**(4): 350-357.
- Whittle, H., J. Morris, J. Todd, T. Corrah, S. Sabally, J. Bangali, P. T. Ngom, M. Rolfe and A. Wilkins (1994). "HIV-2-infected patients survive longer than HIV-1-infected patients." AIDS **8**(11): 1617-1620.
- Wilson, N. J., K. Boniface, J. R. Chan, B. S. McKenzie, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, B. Basham, K. Smith, T. Chen, F. Morel, J. C. Lecron, R. A. Kastelein, D. J. Cua, T. K. McClanahan, E. P. Bowman and R. de Waal Malefyt (2007). "Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells." Nat Immunol **8**(9): 950-957.
- Wolk, K., H. S. Haugen, W. Xu, E. Witte, K. Waggie, M. Anderson, E. Vom Baur, K. Witte, K. Warszawska, S. Philipp, C. Johnson-Leger, H. D. Volk, W. Sterry and R. Sabat (2009). "IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not." J Mol Med (Berl) **87**(5): 523-536.

Wolk, K., S. Kunz, E. Witte, M. Friedrich, K. Asadullah and R. Sabat (2004). "IL-22 increases the innate immunity of tissues." Immunity **21**(2): 241-254.

Wolk, K., E. Witte, E. Wallace, W. D. Docke, S. Kunz, K. Asadullah, H. D. Volk, W. Sterry and R. Sabat (2006). "IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis." Eur J Immunol **36**(5): 1309-1323.

Woods, C. M., D. N. Hooper, E. H. Ooi, L. W. Tan and A. S. Carney (2011). "Human lysozyme has fungicidal activity against nasal fungi." Am J Rhinol Allergy **25**(4): 236-240.

Woods, J. A., J. M. Davis, J. A. Smith and D. C. Nieman (1999). "Exercise and cellular innate immune function." Med Sci Sports Exerc **31**(1): 57-66.

Wright, H. L., R. J. Moots, R. C. Bucknall and S. W. Edwards (2010). "Neutrophil function in inflammation and inflammatory diseases." Rheumatology (Oxford) **49**(9): 1618-1631.

Wu, H., P. Li, N. Shao, J. Ma, M. Ji, X. Sun, D. Ma and C. Ji (2012). "Aberrant expression of Treg-associated cytokine IL-35 along with IL-10 and TGF-beta in acute myeloid leukemia." Oncol Lett **3**(5): 1119-1123.

Wu, T., L. P. Samaranayake, W. K. Leung and P. A. Sullivan (1999). "Inhibition of growth and secreted aspartyl proteinase production in *Candida albicans* by lysozyme." J Med Microbiol **48**(8): 721-730.

Wu, W., C. Pujol, S. R. Lockhart and D. R. Soll (2005). "Chromosome loss followed by duplication is the major mechanism of spontaneous mating-type locus homozygosis in *Candida albicans*." Genetics **169**(3): 1311-1327.

Wurster, A. L., V. L. Rodgers, A. R. Satoskar, M. J. Whitters, D. A. Young, M. Collins and M. J. Grusby (2002). "Interleukin 21 is a T helper (Th) cell 2 cytokine that specifically inhibits the differentiation of naive Th cells into interferon gamma-producing Th1 cells." J Exp Med **196**(7): 969-977.

Wysong, D. R., L. Christin, A. M. Sugar, P. W. Robbins and R. D. Diamond (1998). "Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene." Infect Immun **66**(5): 1953-1961.

- Xu, H., X. Wang, D. X. Liu, T. Moroney-Rasmussen, A. A. Lackner and R. S. Veazey (2012). "IL-17-producing innate lymphoid cells are restricted to mucosal tissues and are depleted in SIV-infected macaques." Mucosal Immunol **5**(6): 658-669.
- Yamaguchi, Y. and Y. Ouchi (2012). "Antimicrobial peptide defensin: identification of novel isoforms and the characterization of their physiological roles and their significance in the pathogenesis of diseases." Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci **88**(4): 152-166.
- Yang, D., A. Biragyn, L. W. Kwak and J. J. Oppenheim (2002). "Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal." Trends Immunol **23**(6): 291-296.
- Yang, D., O. Chertov, S. N. Bykovskaia, Q. Chen, M. J. Buffo, J. Shogan, M. Anderson, J. M. Schroder, J. M. Wang, O. M. Howard and J. J. Oppenheim (1999). "Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6." Science **286**(5439): 525-528.
- Yang, Y. L. (2003). "Virulence factors of *Candida* species." J Microbiol Immunol Infect **36**(4): 223-228.
- Yoshizaki, K., N. Nishimoto, K. Matsumoto, H. Tagoh, T. Taga, Y. Deguchi, T. Kuritani, T. Hirano, K. Hashimoto, N. Okada and et al. (1990). "Interleukin 6 and expression of its receptor on epidermal keratinocytes." Cytokine **2**(5): 381-387.
- Zelante, T., R. G. Iannitti, A. De Luca, J. Arroyo, N. Blanco, G. Servillo, D. Sanglard, U. Reichard, G. E. Palmer, J. P. Latge, P. Puccetti and L. Romani (2012). "Sensing of mammalian IL-17A regulates fungal adaptation and virulence." Nat Commun **3**: 683.
- Zheng, X., Y. Wang and Y. Wang (2004). "Hgc1, a novel hypha-specific G1 cyclin-related protein regulates *Candida albicans* hyphal morphogenesis." EMBO J **23**(8): 1845-1856.
- Zheng, Y., D. M. Danilenko, P. Valdez, I. Kasman, J. Eastham-Anderson, J. Wu and W. Ouyang (2007). "Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis." Nature **445**(7128): 648-651.
- Zhou, L., M. M. Chong and D. R. Littman (2009). "Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation." Immunity **30**(5): 646-655.

Zhou, Z., N. Barry de Longchamps, A. Schmitt, M. Zerbib, M. C. Vacher-Lavenu, M. Bomsel and Y. Ganor (2011). "HIV-1 efficient entry in inner foreskin is mediated by elevated CCL5/RANTES that recruits T cells and fuels conjugate formation with Langerhans cells." PLoS Pathog **7**(6): e1002100.

Zhu, J., H. Yamane and W. E. Paul (2010). "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)." Annu Rev Immunol **28**: 445-489.

Zilberberg, M. D., A. F. Shorr and M. H. Kollef (2008). "Secular trends in candidemia-related hospitalization in the United States, 2000-2005." Infect Control Hosp Epidemiol **29**(10): 978-980.

Zunino, S. J. and D. Hudig (1988). "Interactions between human natural killer (NK) lymphocytes and yeast cells: human NK cells do not kill *Candida albicans*, although *C. albicans* blocks NK lysis of K562 cells." Infect Immun **56**(3): 564-569.

Annexe 1 – Milieux et solutions

Milieu RPMI supplémenté modifié

RPMI 1640 sans rouge de phénol

Pénicilline/Streptomycine	100 U/mL
Amphotéricine B	0,25 µg/mL
Gentamicine	50 µg/mL
L-glutamine	2 mM
HEPES	20 mM

Solution kétamine/xylazine

1,5 mL Kétamine

0,5 mL Xylazine

Compléter à 10 mL avec de la saline

Solution de lyse des érythrocytes

NH ₄ Cl	155 mM
KHCO ₂	10 mM
EDTA	0,1 mM

Compléter à 1L avec de l'eau distillée stérile

Solution de Ringer 100%

NaCl	2,250 g
KCl	0,105 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,120 g
NaHCO ₃	0,050 g

Compléter avec 1 L d'eau distillée

Autoclaver

Utiliser à 25 % avec 1 % (m/v) de citrate de sodium

Annexe 2 – Articles publiés

Voici la liste les articles publiés auxquels j'ai participé durant mon doctorat.

Wacleche, V. S., N. Chomont, A. Gosselin, P. Monteiro, **M. Goupil**, H. Kared, C. Tremblay, N. Bernard, M. R. Boulassel, J. P. Routy, and P. Ancuta. 2012. *The colocalization potential of HIV-specific CD8+ and CD4+ T-cells is mediated by integrin beta7 but not CCR6 and regulated by retinoic acid*. PLoS One 7:e32964.

Leongson, K., V. Cousineau-Cote, **M. Goupil**, F. Aumont, S. Senechal, L. Gaboury, P. Jolicoeur, J. W. Kronstad, and L. de Repentigny. 2013. *Altered immune response differentially enhances susceptibility to Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii infection in mice expressing the HIV-1 transgene*. Infect Immun 81:1100-13.

Melkoumov, A., **M. Goupil**, F. Louhichi, M. Raymond, L. de Repentigny and G. Leclair. 2013. *Nystatin nanosizing enhances in vitro and in vivo antifungal activity against Candida albicans*. J Antimicrob Chemother. 68(9):2099-2105.

Une copie de ces articles est incluse dans cette annexe.

The Colocalization Potential of HIV-Specific CD8⁺ and CD4⁺ T-Cells is Mediated by Integrin β 7 but Not CCR6 and Regulated by Retinoic Acid

Vanessa Sue Wacleche^{1,2}, Nicolas Chomont³, Annie Gosselin², Patricia Monteiro^{1,2,4}, Mathieu Goupil¹, Hassen Kared^{1,2}, Cécile Tremblay^{1,2}, Nicole Bernard⁵, Mohamed-Rachid Boulassel⁶, Jean-Pierre Routy^{4,6,7}, Petronela Ancuta^{1,2,4*}

1 Department of Microbiology and Immunology, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada, **2** Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Research Center, Saint-Luc Hospital, Montreal, Quebec, Canada, **3** VGTI-Florida, Port St Lucie, Florida, United States of America, **4** INSERM Unit 743, Montréal, Quebec, Canada, **5** Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada, **6** Division of Hematology, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada, **7** Immunodeficiency Service, Montreal Chest Institute, McGill University Health Centre, Montreal, Quebec, Canada

Abstract

CD4⁺ T-cells from gut-associated lymphoid tissues (GALT) are major targets for HIV-1 infection. Recruitment of excess effector CD8⁺ T-cells in the proximity of target cells is critical for the control of viral replication. Here, we investigated the colocalization potential of HIV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T-cells into the GALT and explored the role of retinoic acid (RA) in regulating this process in a cohort of HIV-infected subjects with slow disease progression. The expression of the gut-homing molecules integrin β 7, CCR6, and CXCR3 was identified as a “signature” for HIV-specific but not CMV-specific CD4⁺ T-cells thus providing a new explanation for their enhanced permissiveness to infection *in vivo*. HIV-specific CD8⁺ T-cells also expressed high levels of integrin β 7 and CXCR3; however CCR6 was detected at superior levels on HIV-specific CD4⁺ versus CD8⁺ T-cells. All trans RA (ATRA) upregulated the expression of integrin β 7 but not CCR6 on HIV-specific T-cells. Together, these results suggest that HIV-specific CD8⁺ T-cells may colocalize in excess with CD4⁺ T-cells into the GALT *via* integrin β 7 and CXCR3, but not *via* CCR6. Considering our previous findings that CCR6⁺CD4⁺ T-cells are major cellular targets for HIV-DNA integration *in vivo*, a limited ability of CD8⁺ T-cells to migrate in the vicinity of CCR6⁺CD4⁺ T-cells may facilitate HIV replication and dissemination at mucosal sites.

Citation: Wacleche VS, Chomont N, Gosselin A, Monteiro P, Goupil M, et al. (2012) The Colocalization Potential of HIV-Specific CD8⁺ and CD4⁺ T-Cells is Mediated by Integrin β 7 but Not CCR6 and Regulated by Retinoic Acid. PLoS ONE 7(3): e32964. doi:10.1371/journal.pone.0032964

Editor: Sunil K. Ahuja, South Texas Veterans Health Care System and University Health Science Center San Antonio, United States of America

Received: July 4, 2011; **Accepted:** February 8, 2012; **Published:** March 28, 2012

Copyright: © 2012 Wacleche et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by grants to PA from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP-82849 and HBF-82849), Fondation du CHUM, Fonds de la Recherche en Santé Québec (FRSQ) and the French Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Agence Nationale de Recherche sur le SIDA (ANRS), and Fondation de France. VSW was supported by Doctoral Awards from the Université de Montréal and CIHR. PM and HK were supported by Post-Doctoral Fellowships from ANRS/FRSQ and CIHR, respectively. JPR is a FRSQ Senior Clinician-Scientist. PA received salary support from FRSQ and INSERM. Core facilities were supported by the Fondation du CHUM and the FRSQ-SIDA Infectious Diseases Network. The HIV Primo Infection cohort is funded by the FRSQ-SIDA Infectious Diseases Network, the CIHR (#HOP-103230 to JPR), and the Canadian HIV Trials Network-CIHR (CTN-CIHR #CTN 257 to JPR). The Canadian Cohort of HIV+ Slow Progressors is funded by the CIHR (#MOP-93770 to CT). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

*

Introduction

The human immunodeficiency virus type 1 (HIV) epidemic remains a major global health problem despite major advances made since the discovery of the virus in 1983 [1]. The HIV infection has been known to be associated to a gastrointestinal pathology since the beginning of the epidemic [2,3]. Recent studies in HIV-infected individuals and simian models of infection demonstrated that depletion of CD4⁺ T-cells from gut-associated lymphoid tissues (GALT) occurs very early upon infection [4,5,6,7]. Memory CD4⁺ T-cells, expressing the HIV coreceptor CCR5, massively infiltrate the GALT and are preferential targets of viral replication and depletion [8,9]. The alteration of GALT homeostasis in HIV-infected individuals leads to the impairment of mucosal immunity and microbial translocation from the gut, which can drive chronic immune activation [10,11]. Despite a

partial restoration of mucosal immunity in the GALT of individuals receiving long-term antiretroviral therapies (ART) [12,13], viral reservoirs persist in different cellular and anatomic compartments and represent a major barrier to HIV eradication [14].

A small fraction of HIV-infected individuals control disease progression for a long period of time in the absence of ART and are called long-term nonprogressors (LTNPs) or slow progressors [15]. The LTNPs subjects are generally defined as HIV-infected individuals who remain clinically asymptomatic with non-declining CD4 counts (>500 cells/ μ l), and undetectable plasma viral loads (<50–75 HIV RNA copies/ml) for >10 years [16]. However, LTNPs are very heterogeneous and include individuals with virological and/or immunological control. Virological controllers (also called “elite controllers”) are characterized by undetectable plasma viral loads regardless of their CD4 counts,

while immunological controllers maintain their CD4 counts in the normal range despite detectable plasma viral loads [15,16]. Mechanisms involved in the control of disease progression in LTNPs have been linked to host genetic factors controlling the quality of innate and adaptive immunity [17,18]. The ability of CD8⁺ T-cells to control HIV replication *via* cytotoxic and non-cytotoxic mechanisms is well documented [19,20,21]. However, viral reservoirs persist in LTNPs [22,23], pointing out the inability of the immune system to achieve HIV eradication. This is consistent with the finding that the GALT remains an important target of HIV replication in LTNPs with functional alterations in this compartment contributing to slow disease progression [24]. Nevertheless, the existence of a group of HIV-exposed uninfected individuals, in which HIV-specific CD8⁺ T-cell responses were detected in the cervical mucosa [25], provides proof that protective immunity against HIV can be mounted under specific conditions. Thus, the mechanisms of immune protection against HIV require further investigations.

HIV infection is initiated by a small viral founder population that undergoes mutations to escape T-cell responses [26,27,28]. Limiting viral dissemination from the portal site of entry very early after infection *via* robust anti-viral mechanisms is of paramount importance to prevent the establishment of a chronic HIV infection [28]. Recent studies using a model of simian immunodeficiency virus (SIV)-infection and *in situ* visualization techniques demonstrated that SIV-specific CD8⁺ T-cells (effectors) are recruited into the vaginal mucosa and lymph nodes in close proximity to SIV-infected CD4⁺ T-cells (targets) [29]. The spatial proximity of excess effectors *versus* target cells appears to be critical for the control of SIV replication and dissemination *in vivo* [29]. By analogy, the colocalization potential of HIV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T-cells into tissues such as the GALT might determine the extent of viral dissemination and the outcome of disease progression.

Trafficking of peripheral blood T-cells into the GALT is mediated *via* specific adhesion molecules and chemokine receptors. The integrin $\alpha 4\beta 7$ binds to the mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MadCAM-1) expressed on gut endothelial cells and allows cells to cross the endothelial barrier [30]. The integrin $\alpha E\beta 7$ binds to the E-cadherin expressed on the basolateral surface of intestinal epithelial cells and contributes to cell retention in the intraepithelial compartment [31]. The CCR6 is important in the recruitment of T-cells into Peyer's Patches [32,33,34], while CCR9 mediates T-cell infiltration into lamina propria [35,36,37]. The CCR5 and CXCR3 binding chemokines also regulate infiltration of T-cells into the gut [38,39]. Previous studies reported the expression of gut-homing molecules on HIV-specific CD8⁺ or CD4⁺ T-cells. The HIV-specific CD4⁺ T-cells express the integrin $\beta 7$ and CCR5 [40,41], while HIV-specific CD8⁺ T-cells from the gut express CCR5 and integrin $\alpha E\beta 7$ [42]. In addition, a fraction of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells express CCR6 [43].

Results from our group and those published by others identified CCR6 as a marker for memory CD4⁺ T-cells that are highly permissive to HIV infection *in vitro* [44,45] and carry superior levels of integrated HIV-DNA *in vivo* [44,45]. Also, we demonstrated that treatment with retinoic acid (RA), a metabolite of vitamin A responsible for the imprinting for gut homing [46,47], significantly increased the permissiveness of CCR6⁺ but not CCR6⁻ CD4⁺ T-cells to HIV replication by acting at entry (CCR5 upregulation) and yet unidentified post-entry levels [48]. Thus, CCR6⁺CD4⁺ T-cells may represent sites for active HIV replication into the GALT. The ability of HIV-specific CD8⁺ T-cells to be recruited into the GALT in the vicinity of CCR6⁺CD4⁺

T-cells remains unknown and might be predictive of an efficient control of HIV replication in target cells at the portal sites of entry.

In this study, we investigated the potential of total and HIV-specific CD8⁺ T-cells to colocalize in excess with CCR6⁺CD4⁺ T-cells and explored the role of the RA pathway in regulating the gut-homing potential of these cells. We report here a decreased frequency of CD8⁺ and CD4⁺ T-cells expressing CCR6 in the peripheral blood of HIV-infected subjects regardless of their clinical characteristics of disease progression. In a cohort of HIV-infected subjects with slow disease progression, HIV-specific *versus* CMV-specific CD4⁺ T-cells highly express the gut-homing markers integrin $\beta 7$, CCR6, and CXCR3, suggesting a link between enhanced permissiveness to infection in HIV-specific CD4⁺ T-cells [49] and their gut-homing potential. HIV-specific CD8⁺ T-cells also express the gut-homing molecules integrin $\beta 7$ and CXCR3 but express low levels of CCR6. Thus, HIV-specific CD8⁺ T-cells may migrate into the gut *via* integrin $\beta 7$ and CXCR3 but exhibit a limited potential to colocalize with CD4⁺ T-cell in certain GALT sites where recruitment is dependent on CCR6 (*e.g.*, Peyer's Patches) [32,33,34]. This is consistent with our previous finding that CCR6⁺CD4⁺ T-cells are major sites for HIV-DNA integration *in vivo* [44]. Together these results suggest that, in addition to other previously described cellular features (*e.g.*, antiviral properties, poly-functionality, and exhaustion), the colocalization potential of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells might represent a new parameter to consider in order to predict the efficacy of anti-HIV responses. Future therapeutic strategies should aim at increasing the colocalization potential of HIV-specific effector and target cells in mucosal tissues for a better control of HIV dissemination from the portal sites of entry.

Materials and Methods

Study subjects

Included in the study were three groups of HIV-infected subjects: (i) treatment-naïve with slow disease progression (SP, slow progressors; n = 14), (ii) recently infected untreated (RI; n = 18), and chronically infected under viral-suppressive anti-retroviral therapy (CI on ART; n = 20). A cohort of n = 13 HIV-uninfected subjects were included in this study as controls. Tables 1, 2, and 3 contain information on the CD4 and CD8 counts, plasma viral loads, and time since infection of SP, RI, and CI on ART HIV-infected subjects, respectively. At the time of leukapheresis, 9/14 SP subjects satisfied the long-term nonprogressor (LTNP) criteria, which include >7 years time since infection, low to undetectable plasma viral load in the absence of ART, and CD4 counts >500 cells/ μ l [15,16], while 5/14 SP subjects had CD4 counts <500 cells/ μ l (Table 1). Among the later group, three subjects (SP 005, 011, 0108) were infected for >19-years and had detectable plasma viral loads, while two subjects (SP 015, 0102) had undetectable plasma viral loads and time since infection >9-years (Table 1). SP subjects with CD4 counts <500 cells/ μ l were not treated as they lacked clinical signs of immunological failure and maintained their plasma viral load <10⁴ HIV RNA copies/ml. CI on ART subjects received various antiviral regimens containing a protease inhibitor, a non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor, or three nucleoside reverse transcriptase inhibitors, as we previously reported [44]. Plasma viral load was measured using the Amplicor HIV-1 monitor ultrasensitive method (Roche). PBMCs (10⁹–10¹⁰ cells) were collected from HIV-infected and uninfected subjects by leukapheresis, as previously reported [50]. HIV-subjects were recruited *via* the HIV Primo Infection cohort at the McGill University Health Centre, Royal Victoria Hospital, Montreal, or from the Canadian Cohort of HIV+ Slow Progressors.

Table 1. Clinical parameters of HIV-infected subjects with slow disease progression (SP).

Subjects	CD4 counts [#]	CD8 counts [#]	Plasma viral load ^{&}	Time since infection*	ART
SP 001	860	1148	158	15	No
SP 005	435	694	1862	19	No
SP 006	991	921	<50	15	No
SP 007	720	631	<50	19	No
SP 008	670	475	<50	15	No
SP 011	325	941	5370	19	No
SP 015	448	403	<50	16	No
SP 0101	1080	1320	<50	11	No
SP 0102	440	162	<50	9	No
SP 0105	780	1020	15920	12	No
SP 0106	520	1790	86128	12	No
SP 0107	720	2840	1769	18	No
SP 0108	387	465	2937	21	No
SP 0109	670	740	1942	19	No
Median	670	831	964	16	

[#], cells/ μ l;

[&], HIV RNA copies per ml plasma (\log_{10});

^{*}, years; ART, antiretroviral therapy.

doi:10.1371/journal.pone.0032964.t001

Ethics statement

This study using PBMC samples from HIV-infected and uninfected subjects, was conducted in compliance with the principles included in the Declaration of Helsinki. This study

received approval from the Institution Review Board of the McGill University Health Center and CHUM-Research Center, Montreal, Canada. All blood donors provided written informed consent for their participation to the study.

Table 2. Clinical parameters of recently HIV-infected (RI) untreated subjects.

Subjects	CD4 counts [#]	CD8 counts [#]	Plasma viral load ^{&}	Time since infection*	ART
RI 001	704	1081	68412	9	No
RI 002	310	350	200363	46	No
RI 003	522	366	2021	5	No
RI 004	691	1122	8714	12	No
RI 005	341	372	16883	5	No
RI 006	483	930	366646	2	No
RI 007	857	1499	93223	3	No
RI 008	475	640	56838	2	No
RI 009	338	1829	81984	4	No
RI 010	378	779	93706	2	No
RI 011	443	736	176557	5	No
RI 012	442	538	36349	5	No
RI 013	571	1266	5897	7	No
RI 014	824	626	1167770	6	No
RI 015	494	1055	15703	16	No
RI 016	730	1310	97044	25	No
RI 017	255	988	52835	25	No
RI 018	316	376	57154	8	No
Median	479	855	62,783	5.7	

[#], cells/ μ l;

[&], HIV RNA copies per ml plasma (\log_{10});

^{*}, months; ART, antiretroviral therapy.

doi:10.1371/journal.pone.0032964.t002

Table 3. Clinical parameters of chronically HIV-infected subjects under long-term viral suppressive ART (CI on ART).

Subjects	CD4 counts [#]	CD8 counts [#]	Plasma viral load ^{&}	Time since infection [*]	ART
CI 001	890	673	<50	57	Yes
CI 002	463	757	<50	152	Yes
CI 003	602	767	<50	158	Yes
CI 004	563	613	<50	86	Yes
CI 005	424	461	<50	84	Yes
CI 006	731	413	<50	51	Yes
CI 007	834	527	<50	38	Yes
CI 008	552	715	<50	139	Yes
CI 009	671	1120	<50	242	Yes
CI 010	510	765	<50	61	Yes
CI 011	799	1727	<50	62	Yes
CI 012	501	278	<50	90	Yes
CI 013	344	642	<50	59	Yes
CI 014	604	1281	<50	53	Yes
CI 015	443	322	<50	18	Yes
CI 016	599	923	<50	86	Yes
CI 017	688	1273	<50	100	Yes
CI 018	434	583	<50	165	Yes
CI 019	492	582	<50	170	Yes
CI 020	529	690	<50	49	Yes
Median	558	682	<50	85	

[#], cells/ μ l;

[&], HIV RNA copies per ml plasma (\log_{10});

^{*}, months; ART, antiretroviral therapy.

doi:10.1371/journal.pone.0032964.t003

Antibodies and polychromatic flow cytometry analysis

Fluorochrome-conjugated Abs used for polychromatic flow cytometry analysis were CD3-Pacific Blue (UCHT1), CD3-PE/Cy7 (SK7), CD4-Alexa700 (RPA-T4), CD8 APC-Cy7 (SKI), CCR4-PE/Cy7 (1G1), CXCR3-PE/Cy5 (1C6), CD154-PE/Cy5 (89-76), CCR5-PE (2D7), β 7-PE/Cy5 (FIB504), CCR6-PE (11A9) and IFN- γ -Alexa700 (B27) (BD Biosciences); CXCR3-FITC (49801) (R&D Systems); β 7-PE (FIB504) and IL-17A-PE (ebio64-DEC17) and TNF- α -Pacific Blue (MAB11) (eBioscience). The β 7 chain may associate with the α 4 chain to form the α 4 β 7 integrin or with the α E chain to form the α E β 7 integrin. In previous studies, we demonstrated that the majority of peripheral blood T cells expressed α 4 but not the α E chain [48]. Based on this evidence, we can assume the antibody against the β 7 chain used in our study identifies the α 4 β 7 dimer.

For extracellular staining, PBMCs were washed with FACS buffer (PBS 1X, 10% FBS (v/v) (Sigma), 0.02% sodium azide (weight/volume)), stained with specific antibodies for 20 minutes at 4°C, washed with FACS buffer, and fixed with a 2% paraformaldehyde buffer. For cell phenotype analysis of antigen-specific T-cells by flow cytometry, 200–5,000 events were acquired using a BD LSRII flow cytometer. A viability stain (Vivid, Invitrogen) was included in the specific staining cocktails to exclude dead cells from our analysis. Results were analyzed using the BD Diva software. Prior to use, all Abs were titrated for an optimal signal to noise ratio. All Abs cocktails were validated by comparing single to multiple staining, and gates were established using fluorescence minus one (FMO), as previously described [44].

HIV-1 peptide pool preparation

Stimulatory peptides were 15-mers with 11 amino acid overlaps corresponding to HIV-1 clade B consensus Gag (n = 123), Nef (n = 49), and Pol (n = 249) (National Institute of Health (NIH) AIDS Research and Reference Reagent Program, Germantown, MD). Each peptide was diluted in DMSO at 12.5–50 mg peptide/ml, depending on the peptide solubility and stored at -80°C . These were used for the preparation of peptide pools (50–100 μ g peptide/ml), containing 11 to 28 peptides per pool, as described in Table 4 and Table S1. Pools equivalent to the complete sequence of Nef (100 μ g peptide/ml), Gag (100 μ g peptide/ml), and Pol (50 μ g peptide/ml) proteins were also prepared. Peptide pools were stored at -80°C and used for CD154 assays (10 μ g peptide/ml) and proliferation assays (500 ng peptide/ml).

Candida albicans hyphae culture and lysis

Candida albicans hyphae was used as a positive control for the induction of IL-17 production by T-cells (Figure S1), as previously described [51]. *Candida albicans* LAM-1 strain was provided by Dr. Louis de Repentigny (University of Montreal, Montreal, Quebec, Canada), as colonies in a Petri dish. From the isolated colonies, the yeast form was cultured overnight at 37°C in Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium (BD Bioscience). To induce the transition from the yeasts form to hyphae, $0.1\text{--}0.5 \times 10^6$ yeasts/ml were cultured in YPD media 20% FBS and incubated for 4 hours at 37°C. The hyphae generated were washed and resuspended at 2×10^6 cells/100 μ l in PBS (GIBCO). Micro glass-beads (SIGMA) were added, and cell lysis was performed using the FastPrep FPI20 instrument (Thermo Savant, Carlsbad, CA). Cells

Table 4. Screening for HIV-1 specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells responses using the cell proliferation CFSE dilution assay.

Subjects	% CFSE ^{low} T-cells									
	SP 001		SP 006		SP 007		SP 011		SP 015	
T-cells	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Medium [#]	0.06	0.12	0.12	0.21	0.13	0.1	0.14	0.13	0.11	0.15
SEB	39.8 ^{&}	49.9	21.5	39.01	40.76	42.07	37.36	42.57	53.01	55.27
CMV pp65	1.05	2.3	0.36	3.9	57.69	8.94	2.32	3.71	25.58	25.99
HIV p24	- [#]	-	-	-	1.7	1.4	-	-	0.74	1.17
Nef ₅₁₃₉₋₅₁₈₇	0.23	0.57	-	-	-	2.87	-	0.36	0.27	0.69
Nef ₅₁₃₉₋₅₁₆₃	0.2	0.32	-	-	-	2.1	-	-	-	0.44
Nef ₅₁₆₄₋₅₁₈₇	-	0.34	-	-	-	0.52	-	-	-	-
Gag ₇₀₅₋₈₂₇	0.5	5.55	0.55	1.28	1.38	13.92	-	1.26	1.1	3.03
Gag ₇₀₅₋₇₂₈	0.31	1.18	-	-	0.29	0.5	-	1.14	-	-
Gag ₇₂₉₋₇₅₂	-	-	-	-	-	2.91	-	-	0.28	-
Gag ₇₅₃₋₇₇₆	0.21	2.29	-	-	1.73	1.48	-	-	-	-
Gag ₇₇₇₋₈₀₀	0.24	2.33	-	-	0.61	19.53	-	0.4	0.86	2.19
Gag ₈₀₁₋₈₂₇	-	-	-	-	-	-	-	-	0.74	0.78
Pol ₄₆₁₋₇₀₉	0.54	4.13	0.25	0.89	0.38	6.38	-	1.13	0.25	2.26
Pol ₄₆₁₋₄₈₄	-	-	-	-	-	0.32	-	-	-	-
Pol ₄₈₅₋₅₀₈	0.19	-	-	-	-	-	-	-	0.45	0.4
Pol ₅₀₉₋₅₃₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pol ₅₃₃₋₅₅₆	0.22	0.23	-	-	-	-	-	-	0.29	4.75
Pol ₅₅₇₋₅₈₀	-	-	-	-	-	3.89	-	-	-	0.38
Pol ₅₈₁₋₆₀₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5
Pol ₆₀₅₋₆₂₈	0.39	0.39	0.3	-	-	0.29	-	-	-	1.28
Pol ₆₂₉₋₆₅₂	0.45	0.47	-	-	3.79	0.24	-	-	-	0.73
Pol ₆₅₃₋₆₇₄	0.54	0.47	-	-	-	0.21	-	-	-	0.31
Pol ₆₇₅₋₆₉₈	0.44	2.58	0.24	-	-	0.22	-	-	0.32	0.89
Pol ₆₉₉₋₇₀₉	0.42	0.37	-	-	-	-	-	-	-	-
Nef Gag Pol	1.87	9.21	0.34	1.01	1.47	14.05	0.56	1.92	0.82	3.65

[#], background proliferation;

[&], T-cell proliferation was considered positive when the % of CFSE^{low} T-cells in antigen-stimulated compared to the background was >2-fold higher.

doi:10.1371/journal.pone.0032964.t004

were lysed at a speed of 5 meter/second 4 times for 30 seconds and then placed on ice for 2 minutes; this step was repeated 10 times. Lysates were stored frozen at -20°C. Proliferation assays were performed to determine the optimal immunogenic concentrations of *Candida albicans* hyphae.

CD154/CD40L assay

To identify antigen-specific CD4⁺ T-cells, the CD154/CD40L assay was performed as previously described (89). Briefly, PBMC from HIV-infected subjects were resuspended in RPMI 1640 (GIBCO), 100 units/ml Penicillin (GIBCO), 100 µg/ml Streptomycin (GIBCO), and 2 mM of L-glutamine (RPMI) with 10% FBS (SIGMA) at 10×10⁶ cells/ml. Cell suspension (200 µl/well) were plated into 96-well plates and stimulated with 1 µg/ml *Staphylococcal enterotoxin B* (SEB) (Toxin Technology), 5 µg/ml *Cytomegalovirus* (CMV) pp65 peptide pool (Miltenyi), 5 µg/ml recombinant HIV-p24 protein (ImmunoDiagnostics, Inc.), or 10 µg/ml of HIV peptide pools (NIAID AIDS Reagent Program) in the presence of 20 µl/well of anti-CD154-PE/Cy5 Abs (BD Biosciences) and 2 µM of monensin (SIGMA) for 16 hrs at 37°C. Cells were then harvested, stained for surface markers with

fluorescence-conjugated Abs against CD3, CD4, integrin β7, CCR6, CXCR3, and CCR4, and analyzed by flow cytometry for the expression of homing markers on CD3⁺CD4⁺CD154⁺ T-cells.

CFSE dilution assay

To detect antigen-specific T-cell proliferation, the Carboxy Fluorescein Succinimidyl Ester (CFSE) dilution assay was performed as previously described [52]. Briefly, PBMC were loaded with 0.5 µM CFSE (Sigma) for 8 minutes at room temperature. The optimal concentration for CFSE was determined by titration for each CFSE lot. Cells were then washed once with PBS and once with RPMI 1640, and then cultured in 5 ml polypropylene tubes (Becton Dickinson) at 2×10⁶ cells/ml in RPMI with 10% human serum (Gemini). Cells were stimulated with HIV peptide pools in which each peptide was at a concentration of 500 ng/ml, 5 µg/ml recombinant HIV-p24 protein (ImmunoDiagnostics), 25 ng/ml SEB (Toxin Technologies) or 1 µg/ml pp65 CMV peptide pool (Miltenyi) for 6 days at 37°C. Cells were harvested, stained with fluorescence-conjugated Abs against CD3, CD4, integrin β7, CCR6, CXCR3, CCR4, and/or CCR5, and analyzed by flow cytometry for the phenotype

of CD3⁺CD4⁺CFSE^{low} and CD3⁺CD4⁻CFSE^{low} cells. In preliminary experiments, we demonstrated that the majority (>95%) of CD3⁺CD4⁻ cells were CD8⁺ T-cells. When indicated, a viability stain (Vivid; Invitrogen) was included in staining cocktails to exclude dead cells from analysis.

Intracellular staining for cytokines

CFSE loaded PBMC were stimulated with antigen for 5 days and then restimulated with 50 ng/ml PMA (SIGMA) and 1 µg/ml Ionomycin (SIGMA) in the presence of 10 µg/ml Brefeldin A (SIGMA) for 18 hours. The production of IFN-γ, TNF-α, and IL-17A was measured by intracellular staining with appropriate Abs using the BD Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol.

Statistics

The significance of differences observed between-groups was assessed using Mann-Whitney tests (for unpaired samples) and Paired t-test (for paired samples) as specified in figure legends. The correlation between study variables was assessed using a Spearman correlation test and linear regression models. All statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 5 software. P-values <0.05 were considered significant.

Results

Decreased frequency of CCR6-expressing CD8⁺ and CD4⁺ T-cells in the peripheral blood of HIV-infected subjects with slow and rapid disease progression: We previously identified CCR6 as a marker for memory CD4⁺ T-cells being highly permissive to HIV infection *in vitro* and major sites for HIV-DNA integration in infected subjects [44,48]. As a consequence, the frequency of circulating CCR6⁺CD4⁺ T-cells is dramatically reduced from the early stages of HIV infection and the normalization of this frequency is not observed under viral suppressive ART [44]. Considering the antiviral properties of CD8⁺ T-cells [19,53], we hypothesized that a robust control of HIV disease progression is dependent on the ability of CD8⁺ T-cells to co-localize with CCR6-expressing CD4⁺ T-cells. To test this hypothesis, the expression of CCR6 was first quantified on peripheral blood CD8⁺ and CD4⁺ T-cells from HIV-infected subjects with slow and rapid disease progression. The cohort of slow progressors (SP; n = 14) included HIV-infected subjects with a median time since infection of 16 years, median CD4 counts of 670 cells/µl, median CD4 counts of 831 cells/µl, and undetectable or low plasma viral loads (median: 964 HIV RNA copies/ml) in the absence of antiretroviral therapy (ART) (Table 1). The cohort of HIV-infected progressors included recently infected untreated (RI; n = 18; median CD4 counts: 479 cells/µl; median CD8 counts: 855 cells/µl; median plasma viral load: 62,783 HIV RNA copies/ml; median time since infection: 5.7 months) (Table 2) and chronically infected under long-term (>1-year) viral-suppressive ART (CI on ART; n = 20; median CD4 counts: 558 cells/µl; median CD8 counts: 682 cells/µl; median plasma viral load: <50 HIV RNA copies/ml; median time since infection: 85 months) subjects (Table 3). The frequency of CCR6-expressing CD8⁺ and CD4⁺ T-cells and the CD8/CD4 ratios within total and CCR6⁺ T-cell fractions were compared between HIV-uninfected and the three groups of HIV-infected subjects.

The frequency of CCR6-expressing CD8⁺ and CD4⁺ T-cells was significantly decreased in RI and CI on ART subjects compared to uninfected controls; unexpectedly, this frequency was also significantly decreased in SP compared to uninfected controls and CI on ART subjects (Figure 1A–B). The CD8/CD4 ratios

within the total T-cell population were significantly higher in RI (median: 1.4), CI on ART (median: 1.4), and SP subjects (median: 2.3) compared to uninfected controls (median: 0.9) and also in SP compared to CI on ART subjects (Figure 1C). This suggests the potential recruitment of excess CD8⁺ T-cells in the vicinity of CD4⁺ T-cells. In contrast, the median CD8/CD4 ratios within the CCR6⁺ fraction were <1 in HIV-infected and uninfected subjects, with no significant differences between RI, CI on ART, and SP subjects (Figure 1D). No significant correlations were found between CD4 counts or plasma viral loads and all four parameters investigated in Figure 1 within the three HIV-infected groups (data not shown). These results demonstrate an alteration in the frequency of CCR6-expressing CD8⁺ and CD4⁺ T-cells in HIV-infected subjects regardless of their clinical characteristics of disease progression. These results suggest the inability of CD8⁺ T-cells to be recruited in excess in the proximity of CCR6⁺CD4⁺ T-cells, and this even in subjects with slow disease progression.

CD4⁺ T-cells specific for HIV versus CMV preferentially express gut-homing markers: HIV preferentially infects HIV-specific CD4⁺ T-cells, while CMV-specific CD4⁺ T-cells are relatively resistant to infection *in vivo* [41,49,54]. This coincides with the fact that HIV-specific CD4⁺ T-cells express higher levels of the HIV CCR5 coreceptor and produce lower levels of CCR5 binding chemokines than do CMV-specific CD4⁺ T-cells [41,49,54]. We hypothesized that differences in viral permissiveness between HIV-specific versus CMV-specific CD4⁺ T-cells are also related to their distinct ability to home into anatomic sites of active viral replication, such as the GALT. To test this hypothesis, we investigated the gut-homing potential on CD4⁺ T-cells specific for HIV versus CMV. The SEB superantigen is known to induce polyclonal T-cell activation [52] and was used as a positive control. The tissue-specific homing molecules studied were integrin β7 for the migration across the GALT endothelium [30,39,46], CCR6 for the migration into the GALT Peyer's Patches [33,55], CXCR3 for the migration into inflammatory sites, including the GALT [30,39,46,56], and CCR4 for the migration into the skin [57]. Experiments were performed with PBMC from seven HIV-infected treatment-naïve subjects with slow disease progression (Table 1), because they exhibited relatively high frequencies of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells (Table 4 and Table S1). This choice is also justified by the fact that the frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells expressing CCR6 is also altered in the peripheral blood of SP subjects compared to uninfected controls (Figure 1).

In a first experimental approach, antigen-specific CD4⁺ T-cells were identified based on their expression of CD154 (CD40 ligand, CD40L) using flow cytometry analysis (Figure S1A), as previously described by others [58]. The PBMCs from HIV-infected individuals were screened for the ability to respond to an antigen panel that included HIV Nef (n = 3), Gag (n = 6) and Pol (n = 11) overlapping peptide pools, HIV-p24 recombinant protein, SEB, and CMV-pp65 recombinant protein (Table S1). The PBMCs were then stimulated with the most immunogenic antigenic panel and the expression of integrin β7, CCR6, CXCR3, and CCR4 was analyzed on antigen-specific CD154⁺CD4⁺ T-cells by polychromatic flow cytometry (Figure S1A–B). The phenotype of CD154⁺CD4⁺ T-cells specific for different HIV peptide pools was highly heterogeneous within the same donor. Also, inter-donor variations were observed in the expression of homing molecules on CD154⁺CD4⁺ T-cells, even those specific for the same HIV peptide pool (Figure S1C). Regardless of this heterogeneity, statistical analysis of homing molecule expression demonstrated that HIV-specific compared to CMV-specific CD154⁺CD4⁺ T-cells expressed significantly higher levels of the integrin β7 (Figure

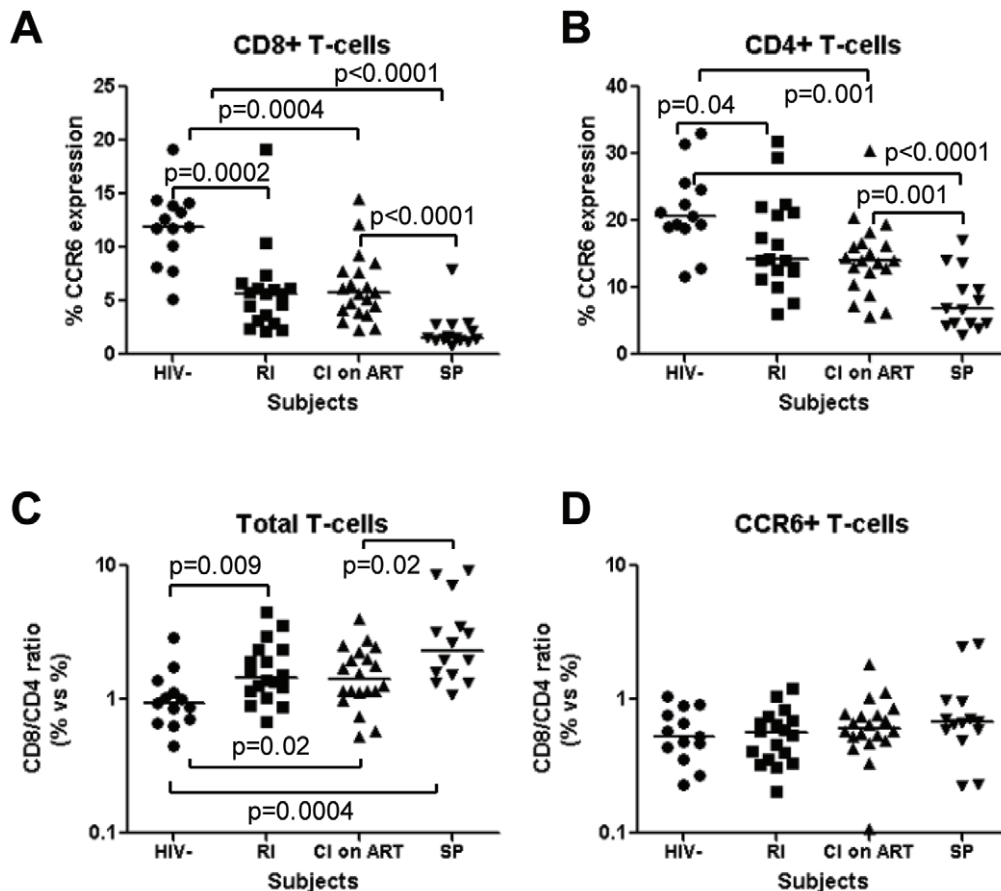


Figure 1. The frequency of CD8⁺ and CD4⁺ T-cells expressing CCR6 is decreased in HIV infected subjects with slow and rapid disease progression. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from HIV-uninfected (HIV-; n = 13) and HIV+ subjects recently infected untreated (RI, n = 18), chronically infected under long-term viral suppressive antiretroviral therapy (CI on ART; n = 20), and slow progressors (SP, n = 14) were stained with a cocktail of fluorescence-conjugated CD3, CD4, and CCR6 Abs. The frequency of (A) CD3⁺CD4⁻ T-cells (referred to as CD8⁺ T-cells) and (B) CD3⁺CD4⁺ T-cells (referred to as CD4⁺ T-cells) expressing CCR6 was quantified by polychromatic flow cytometry and compared between HIV-uninfected controls and RI, CI on ART, and SP HIV-infected subjects. The CD8/CD4 T-cell ratios were calculated within the total (C) and CCR6⁺ T-cell fractions (D) in the group of HIV-uninfected controls and the three groups of HIV-infected subjects. Horizontal bars indicate median values. Mann-Whitney p-values are indicated in the figures.
doi:10.1371/journal.pone.0032964.g001

S1D). In addition, HIV-specific compared to SEB-specific T-cells displayed increased expression of the integrin $\beta 7$, CCR6, CXCR3, and CCR4 (Figure S1D). These results demonstrate that HIV-specific CD154⁺CD4⁺ T-cells distinguish from cells of other antigenic specificities (CMV, SEB) by their high expression of both gut-homing markers integrin $\beta 7$ and CCR6.

In a second experimental approach, antigen-specific CD4⁺ T-cells were identified based on their proliferation potential (CFSE^{low} phenotype) using the CFSE dilution assay (Figure 2A), as previously described [52]. The PBMCs from HIV-infected individuals were screened for the ability to respond to an antigen panel that included HIV Nef (n = 3), Gag (n = 6) and Pol (n = 11) overlapping peptide pools, HIV-p24 recombinant protein, SEB, and CMV-pp65 recombinant protein (Table 4). The PBMCs were then stimulated with the most immunogenic antigenic panel and the expression of integrin $\beta 7$, CCR6, CXCR3, and CCR4 was quantified on CFSE^{low} CD4⁺ T-cells by polychromatic flow cytometry (Figure 2B). Similar to data obtained on HIV-specific CD154⁺CD4⁺ T-cells (Figure S1C), inter- and intra-donor variations were observed in the phenotype of CFSE^{low} CD4⁺ T-cells specific for different HIV peptide pools (Figure 2C). CXCR3 was expressed by the majority of antigen-specific cells, while the

expression of integrin $\beta 7$, CCR6 and CCR4 was limited to a fraction of cells (Figure 2C). The CD4⁺ T-cells proliferating in response to the HIV_{NefGagPol} peptide pool *versus* CMV from matched donors expressed significantly higher levels of integrin $\beta 7$, CCR6, and CXCR3, with not significant differences regarding CCR4 expression (Figure 2D). The same trend was observed when CD4⁺ T-cells specific for all HIV peptide pools were compared with those specific for CMV from five different donors (Figure S2A). The HIV-specific CD4⁺ T-cells identified as CD154⁺ *versus* CFSE^{low} cells differed in the expression of homing receptors; these differences were observed when cells were stimulated with distinct (Nef *versus* Gag, respectively) or the same HIV antigenic pools (HIV-p24) (Figure S1C and Figure 2C). However, the expression at high levels of both integrin $\beta 7$ and CCR6 remained a unique feature of HIV-specific CD4⁺ T-cells when compared to CMV-specific cells (Figures S1D and S2A, and Figure 2D). This unique particularity of HIV-specific CD4⁺ T-cells may confer them the ability to migrate into the GALT, a major site of HIV replication *in vivo* [8,59].

CCR6 is a well established marker for Th17 and Th1Th17 cells with a CCR4⁺CCR6⁺ and CXCR3⁺CCR6⁺ phenotype [60]. Our results demonstrated that only a minority of CFSE^{low} HIV-specific

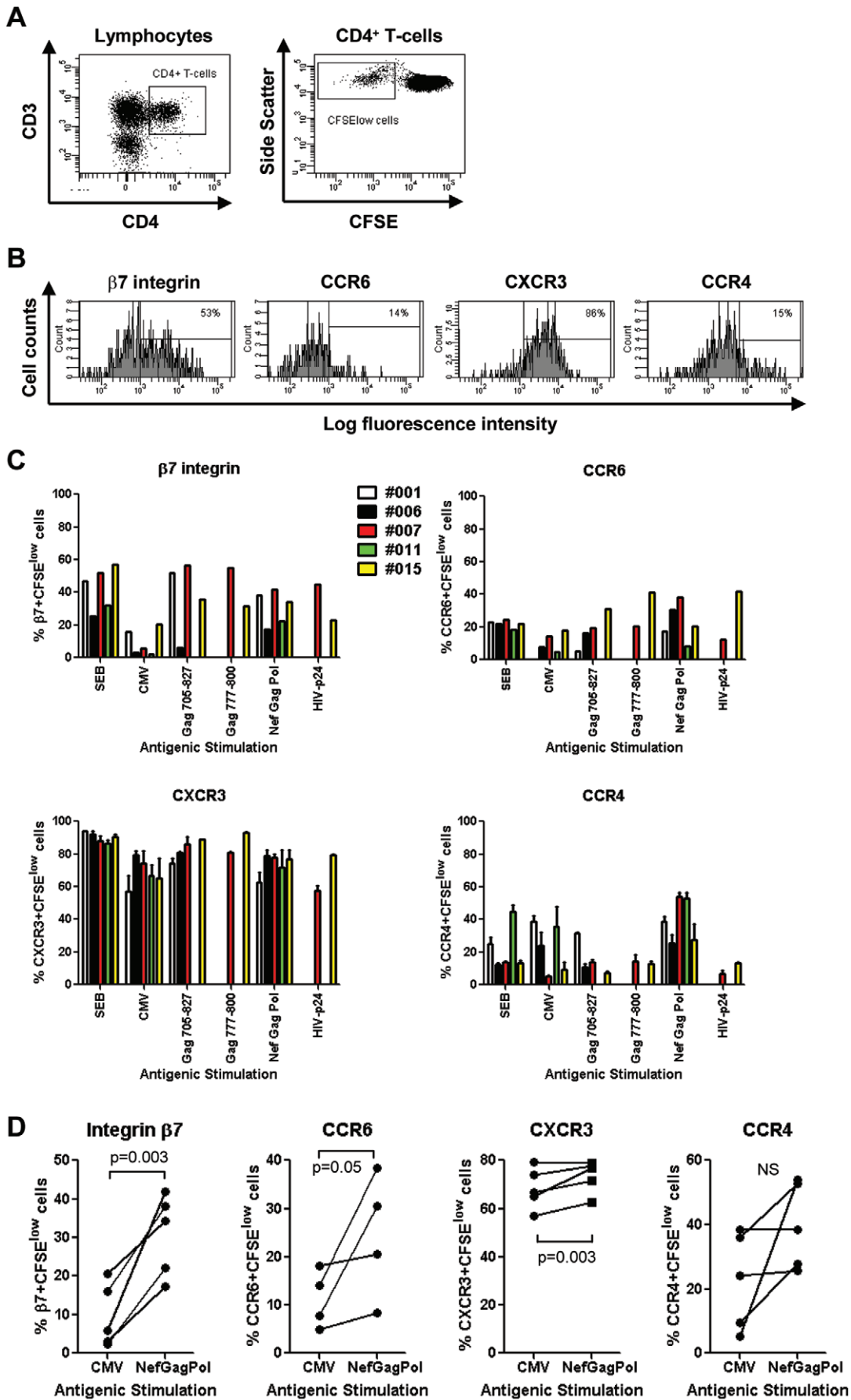


Figure 2. Preferential gut-homing potential of HIV-specific versus CMV-specific CD4⁺ T-cells. PBMC from SP subjects were loaded in CFSE (0.5 μ M) and stimulated with different HIV Nef, Gag, Pol peptide pools (500 ng/ml), recombinant HIV-p24 (5 μ g/ml), SEB (25 ng/ml), or the recombinant CMV-pp65 peptide pool (1 μ g/ml) for 6 days at 37°C. Antigen-specific T-cells were identified as CFSE^{low} cells, as previously described [52]. Cells were stained with a cocktail of fluorescence-conjugated CD3, CD4, integrin β 7, CCR6, CXCR3, and CCR4 Abs and analyzed by polychromatic flow cytometry for (A) the frequency of CFSE^{low}CD3⁺CD4⁺ T-cells (referred to as CD4⁺ T-cells) and (B–D) the expression of integrin β 7, CCR6, CXCR3, and CCR4 on antigen-specific CFSE^{low}CD4⁺ T-cells. (A–B) Shown are results from one donor (i.e., SP 007) generated upon stimulation of PBMC with HIV Gag_{705–827} peptide pool, representative of results generated with cells from five different donors. (C) Shown is the expression of the homing receptors on CFSE^{low}CD4⁺ T-cells specific for SEB, CMV and different HIV peptide pools in five different SP subjects. (D) Shown is the homing molecule expression on matched CFSE^{low}CD4⁺ T-cells specific for CMV versus HIV_{NefGagPol} peptide pool in four-five different SP subjects. Paired T-test p-values are indicated in the figures.
doi:10.1371/journal.pone.0032964.g002

CD4⁺ T-cells produced IL-17, while a larger fraction produced IFN- γ and TNF- α (Figure S3). These results indicate that HIV-specific CD4⁺ T-cells exhibit a Th1Th17 polarization profile. We previously demonstrated that a Th1Th17 profile is favorable to active HIV replication *in vitro* [44]. Therefore, HIV-specific cells from SP subjects may be highly permissive to HIV, as previously demonstrated in HIV progressors [41,49,54].

The colocalization potential of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells is mediated by the integrin β 7 but not CCR6: The antiviral properties of CD8⁺ T-cells are well characterized [19,20,21] and depend on their ability to colocalize in excess with target cells, such as CD4⁺ T-cells [28,29]. We next investigated the expression of gut-homing molecules on HIV-specific CD8⁺ T-cells in order to evaluate their ability to colocalize with HIV-specific CD4⁺ T-cells for an efficient control of HIV replication *in vivo*. In preliminary experiments, we demonstrated that the majority of CD8⁺ T-cells exhibited a CD3⁺CD4⁻ phenotype (data not shown). Antigen-specific CD8⁺ T-cells were identified as CFSE^{low} cells (Figure 3A) and tested for their expression of the integrin β 7, CCR6, CXCR3, and CCR4 (Figure 3B). Similar to antigen-specific CD4⁺ T-cells (Figure 2C), the expression of the homing receptors on CFSE^{low} CD8⁺ T-cells was subject to inter-donor variations (Figure 3C). Despite this heterogeneity, HIV_{NefGagPol}-specific versus CMV-specific CFSE^{low} CD8⁺ T-cells from matched donors expressed significantly higher levels of integrin β 7, while no significant differences were observed in the levels of CCR6, CXCR3, and CCR4 expression (Figure 3D). The same results were observed when CD8⁺ T-cells specific for all HIV peptide pools were compared with those specific for CMV (Figure S2B). These results suggest an increased ability of HIV-specific versus CMV-specific CD8⁺ T-cells to migrate *via* integrin β 7 into the GALT, which is likely a site for the initial priming of HIV-specific T-cells.

To further investigate the colocalization potential of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, the frequency of cells expressing gut-homing molecules was compared between matched CD4⁺ and CD8⁺ T-cells proliferating in response to specific HIV peptide pools. Results depicted in Figure 4A show that HIV-specific CD8⁺ compared to CD4⁺ T-cells express significantly higher levels of integrin β 7, lower levels of CCR6 and CCR4, and similarly high levels of CXCR3. Spearman correlation and linear regression models were applied and demonstrated a positive correlation between the frequency of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells expressing the integrin β 7 and CXCR3; this correlation was not observed for CCR6 and CCR4 (Figure 4B). Moreover, there was a positive correlation between the frequency of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells co-expressing the integrin β 7 and CXCR3 (Figure 4C). Furthermore, the β 7⁺CXCR3⁺ phenotype appears to be a unique feature of HIV-specific T-cells since the frequency of β 7⁺CXCR3⁺ cells was significantly higher in HIV_{NefGagPol}-specific versus CMV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells from four matched SP subjects (Figure S2C). The proliferation of CD8⁺ compared to CD4⁺ T-cells in response to a specific HIV peptide pool was

significantly higher in all five HIV-infected subjects (Figure 4D), with median CD8/CD4 ratios of 3.2, 2.3, 4.1, 5.6, and 2.8 in SP subjects 001, 006, 007, 011, and 015, respectively (data not shown). These results suggest that a significant fraction of HIV-specific CD8⁺ T-cells may colocalize with CD4⁺ T-cells (at high CD8/CD4 ratios) in certain anatomic sites of the GALT where homing depends on integrin β 7 and CXCR3. In contrast, HIV-specific CD8⁺ T-cells express low levels of CCR6 and CCR4 and thus may be impaired in their ability to colocalize and control viral replication in CCR6⁺CCR4⁺ CD4⁺ T-cells, such as Th17 cells [51] which are highly permissive to infection [44,45]. Thus, the low expression of CCR6 on CD8⁺ T-cells may reflect their limited ability to control HIV replication in CD4⁺ T-cells from certain GALT sites such as the Peyer's Patches, where homing depends on CCR6 [32,33,34].

The retinoic acid pathway regulates expression of integrin β 7 but not CCR6 and CCR5 on HIV-specific T-cells: The imprinting for gut-homing is regulated at least in part by RA, a derivative of vitamin A metabolism produced by the intestinal dendritic cells [46,47]. Of note, exposure of CD4⁺ T-cells to RA upregulates integrin β 7 and CCR5 expression and renders them highly permissive to HIV replication [61,62]. Here, we investigated whether RA can be used to manipulate the colocalization potential of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells *via* integrin β 7 and CCR6. With this in mind, PBMC from SP subjects were exposed to the HIV_{NefGagPol} peptide pool, SEB, or CMV in the presence or absence of all-trans RA (ATRA) or the RA antagonist LE540. In preliminary experiments, we demonstrated that at physiological dose (10 nM [61,63]), ATRA did not have any significant effect on cell proliferation, while LE540 at 1 μ g/ml [64] decreased integrin β 7 expression on SEB-specific T-cells without interfering with cell viability (data not shown). The expression of integrin β 7, CCR5, and CCR6 was quantified on CFSE^{low} T-cells by multicolor flow cytometry. Exposure to ATRA and LE540 led to a significant increase and decrease, respectively, in the integrin β 7 expression on CD4⁺ T-cells specific for HIV-, SEB, and CMV and also on CD8⁺ T-cells specific for HIV and SEB (Figure 5A). The ATRA also increased expression of CCR5 on SEB-specific and CMV-specific but not on HIV-specific T-cells (Figure 5B), where levels of CCR5 expression were higher, although not statistically significant due to donor-to-donor variability, compared to those on SEB-specific and CMV-specific T-cells (Paired t-Test $p=0.04$ and $p=0.1$, respectively). In contrast, ATRA and LE540 treatment did not interfere with the expression of CCR6 on antigen-specific CD4⁺ or CD8⁺ T-cells (Figure 5C). These results demonstrate that the RA pathway regulates the expression of integrin β 7 but does not interfere with CCR5 and CCR6 expression on HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells.

To gain more insights into the regulation of trafficking potential of HIV-specific T-cells, we studied the effects of RA and LE540 on the frequency of HIV-specific T-cells with a β 7⁺CCR5⁺ and β 7⁺CCR6⁺ phenotype. The CD4⁺ and CD8⁺ T-cells proliferating

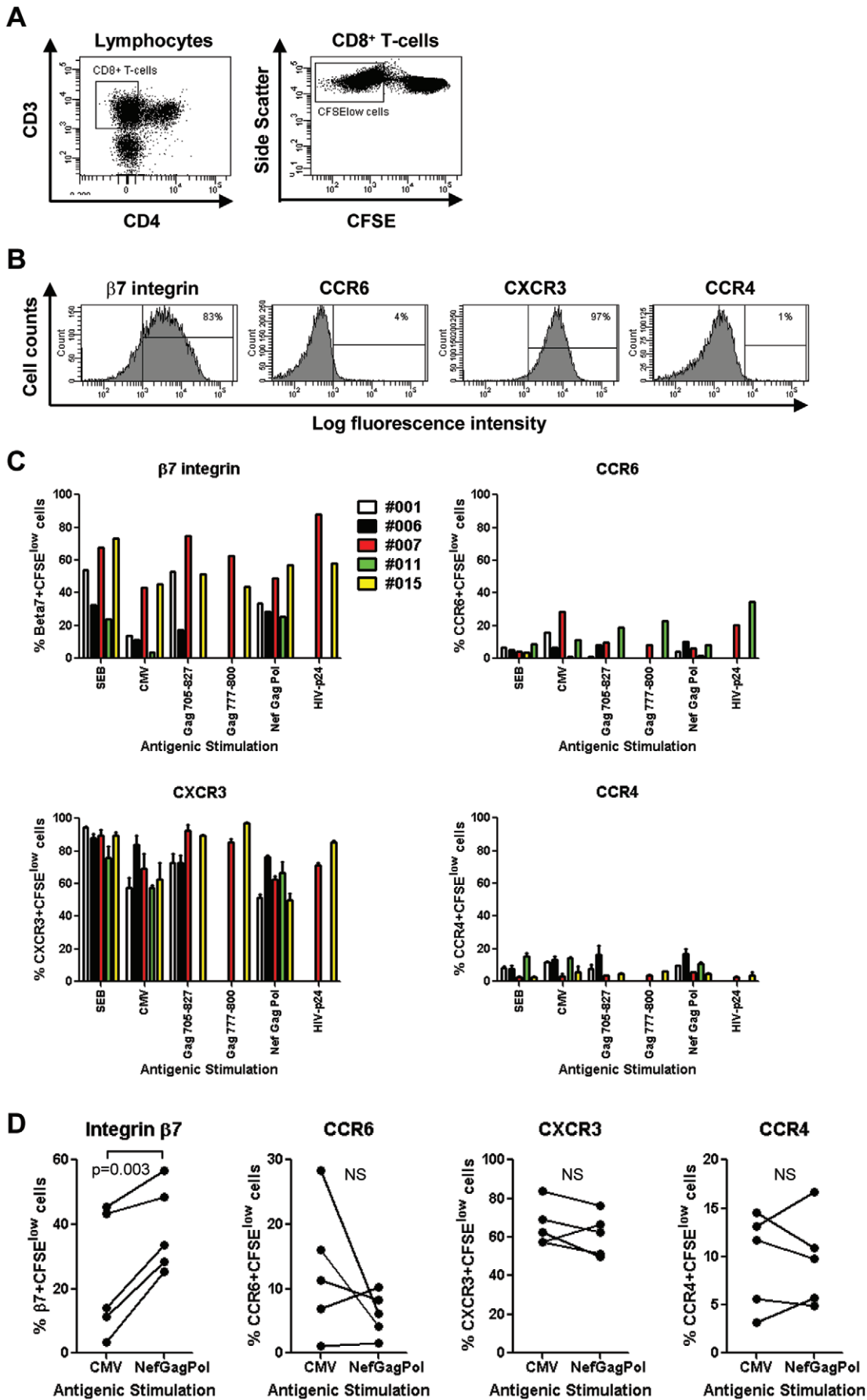


Figure 3. Homing potential of CD8+ T-cells proliferating in response to HIV peptides. PBMC from five SP subjects were stimulated and stained with Abs as in Figure 2. At day 6 of stimulation, cells were analyzed by polychromatic flow cytometry for (A) the frequency of CFSE^{low}CD3⁺CD4⁻ T-cells (referred to as CD8+ T-cells) and (B–D) the expression of β7 integrin, CCR6, CXCR3, and CCR4 on CFSE^{low}CD8+ T-cells. (A–B) Shown are results from one donor (i.e., SP 007) generated upon stimulation with HIV Gag_{705–827} peptide pool. (C) Shown is the expression of the homing receptors on CFSE^{low}CD8+ T-cells specific for SEB, CMV, and different HIV peptide pools in five different SP subjects. (D) Shown is the homing molecule expression on matched CFSE^{low}CD8+ T-cells specific for CMV *versus* HIV_{NefGagPol} peptide pool in five different SP subjects. Paired T-test p-values are indicated in the figures.
doi:10.1371/journal.pone.0032964.g003

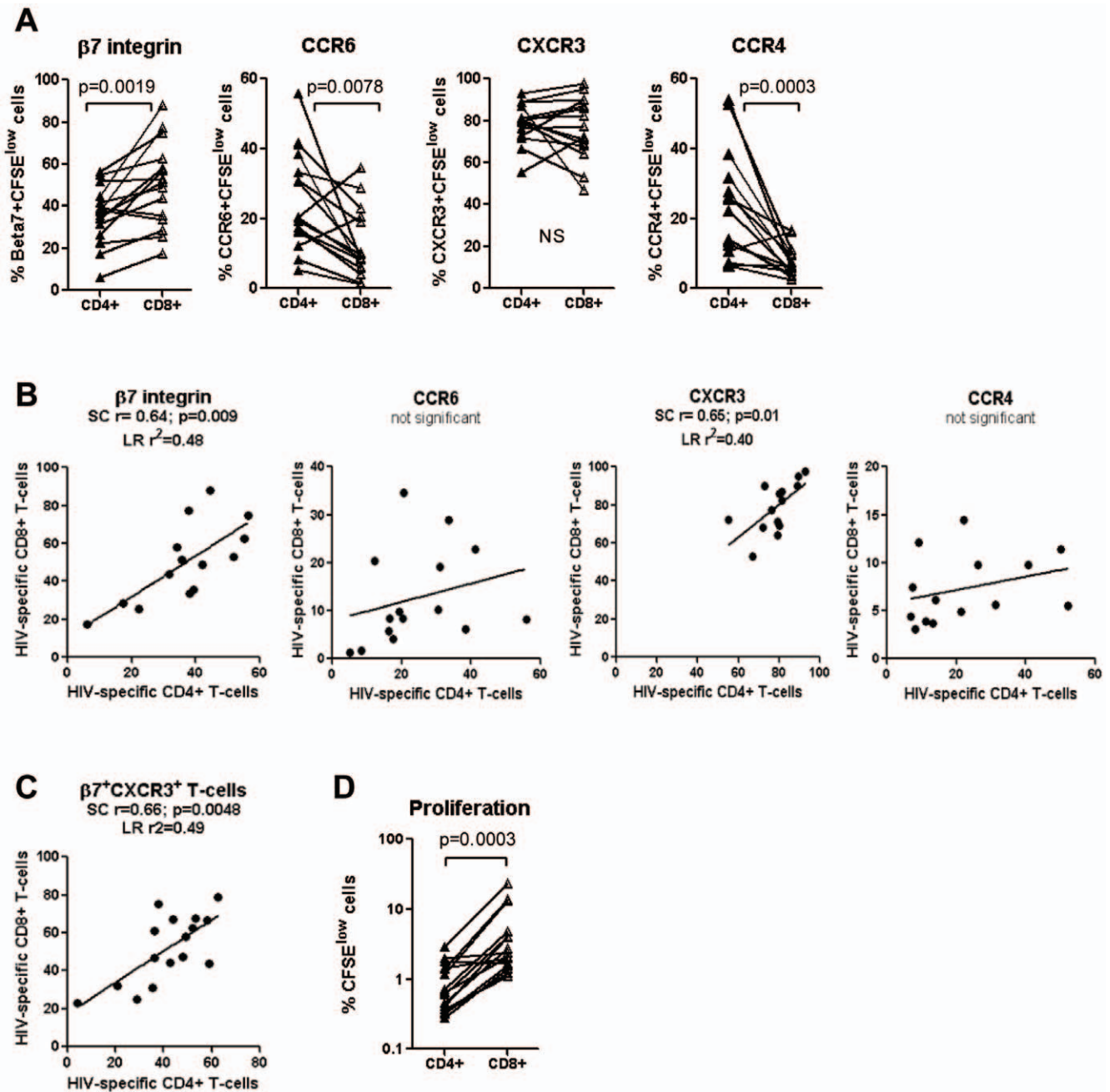


Figure 4. Potential colocalisation of HIV-specific CD8+ and CD4+ T-cells via integrin β7 but not CCR6. (A–C) PBMC from five SP subjects were stimulated with different HIV peptide pools or recombinant HIV-p24 and analyzed by polychromatic flow cytometry for the expression of homing molecules, as described in Figures 2 and 3. HIV-specific CD4+ and CD8+ T-cells were analyzed for (A–C) the expression of the homing molecules β7 integrin, CCR6, CXCR3, and CCR4 (D) the proliferation potential. (A) Shown is the expression of homing molecules on matched CD4+ *versus* CD8+ T-cells specific for different HIV peptide pools in five different SP subjects. Shown are correlations between (B) the frequency of matched HIV-specific CD4+ and CD8+ T-cells expressing β7 integrin, CCR6, CXCR3, or CCR4 alone, and (C) co-expressing the β7 integrin and CXCR3 molecules (β7⁺CXCR3⁺ phenotype). (D) Shown is the percentage of matched CD4+ *versus* CD8+ T-cells proliferating (CFSE^{low}) in response to different HIV peptide pools. Paired T-test p-values are indicated in the Figures A and D. Spearman correlation r and p-values and linear regression r^2 values are indicated in the Figures B and C.
doi:10.1371/journal.pone.0032964.g004

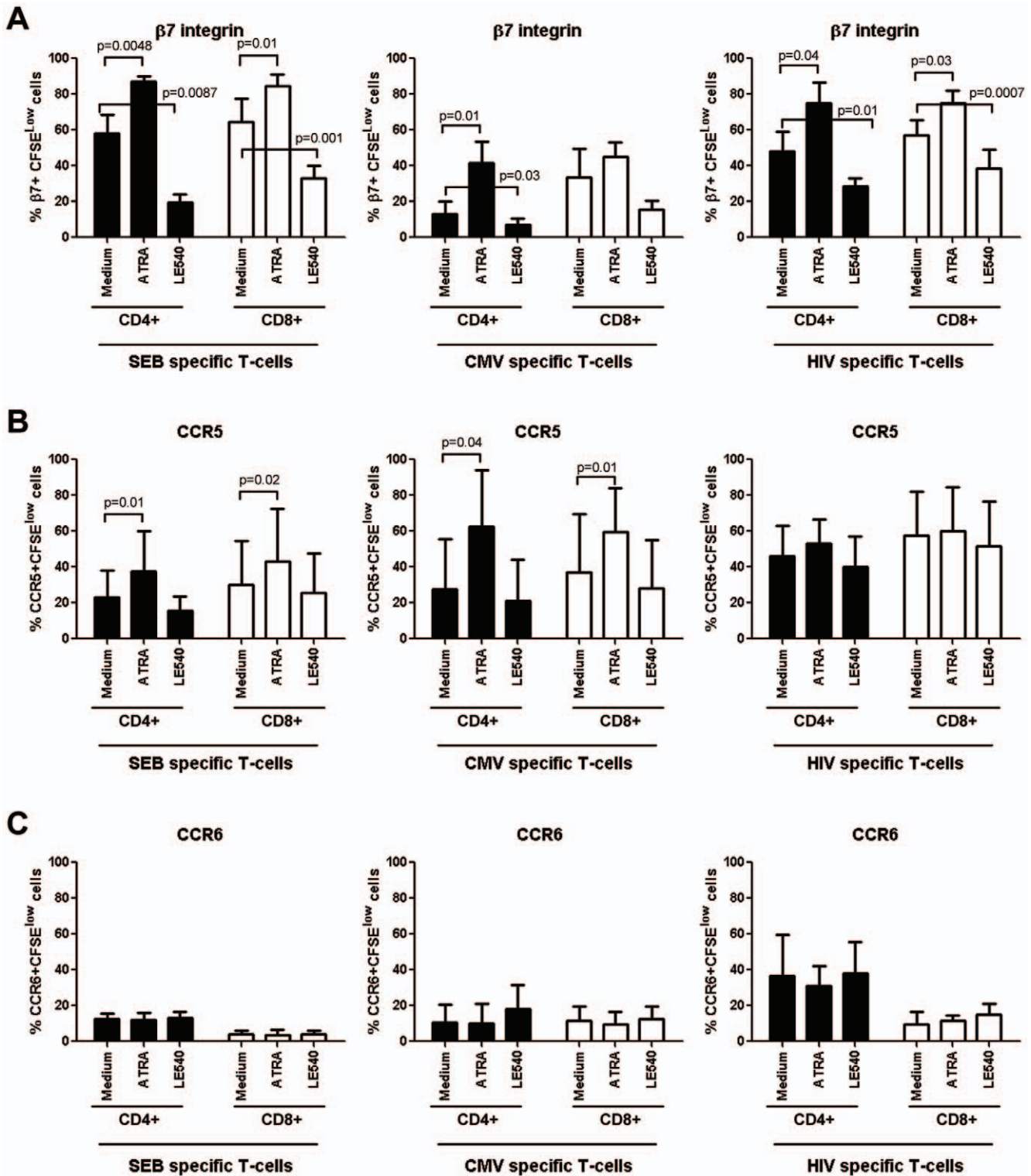


Figure 5. Retinoic acid activation pathway regulates integrin β7 expression on HIV-specific T-cells. PBMC from SP subjects were loaded in CFSE (0.5 μM) and stimulated with HIV_{Nef-Gag-Pol} peptide pool (500 ng/ml), SEB (25 ng/ml), or the recombinant CMV-pp65 peptide pool (1 μg/ml) for 6 days at 37°C in the presence or absence of all-trans-retinoic acid (ATRA; 10 nM) or the RA antagonist LE540 (1 μg/ml). Cells were stained with a cocktail of fluorochrome-conjugated CD3, CD4, integrin β7, CCR5 or CCR6 Abs and analyzed for the expression of (A) integrin β7, (B) CCR5, and (C) CCR6 on CFSE^{low} CD4⁺ and CD8⁺ T-cells specific for SEB, CMV, and HIV antigens. Experiments were performed with cells from four SP subjects (mean±SD). Paired t-Test p-values are indicated in the figures. doi:10.1371/journal.pone.0032964.g005

in response to HIV differed from CMV- or SEB-specific T-cells by an increased frequency of $\beta 7^{+}CCR5^{+}$ T-cells (Figure 6A and C). The pool of HIV-specific CD4⁺ T-cells included higher frequencies of cells with a $\beta 7^{+}CCR6^{+}$ phenotype compared to cells specific for CMV or SEB, while CD8⁺ T-cells specific for HIV, CMV, or SEB included very low frequencies of $\beta 7^{+}CCR6^{+}$ T-cells (Figure 6B). Exposure to ATRA and LE540 led to a significant increase and decrease, respectively, in the frequency of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells with a $\beta 7^{+}CCR5^{+}$ phenotype (Figure 6D). Since ATRA does not modulate CCR5 expression on HIV-specific cells (Figure 5C), the increase in the frequency of $\beta 7^{+}CCR5^{+}$ cells (Figure 6D) is likely due to the upregulation of integrin $\beta 7$ expression on existing CCR5⁺ T-cells. Finally, ATRA and LE540 treatment had no significant effects on the frequencies of HIV-specific CD4⁺ or CD8⁺ T-cells with a $\beta 7^{+}CCR6^{+}$ phenotype (Figure 6E). These results provide evidence that ATRA may be used to enhance recruitment of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells across the intestinal endothelium *via* the integrin $\beta 7$. In contrast, ATRA does not interfere with CCR6 expression and cannot facilitate the *in situ* colocalization of CD8⁺ T-cells with CCR6⁺CD4⁺ T-cells.

Discussion

The GALT is a major site for HIV replication *in vivo* [8,59], with HIV-specific CD4⁺ T-cells being highly permissive to infection [49]. The recruitment of effector CD8⁺ T-cells in the proximity of target CD4⁺ T-cells is a prerequisite for an efficient control of viral replication *in vivo* [29,65]. In this study, we investigated the potential of HIV-specific CD8⁺ T-cells to colocalize in excess with CD4⁺ T-cells in the GALT and explored the role of the retinoic acid (RA) activation pathway in regulating this process. We demonstrated that a large fraction of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells express the gut-homing molecules integrin $\beta 7$ and CXCR3 while CCR6, a marker of HIV permissiveness in CD4⁺ T-cells [44,48], was expressed at high and low levels on HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells, respectively. We also demonstrated that RA upregulated integrin $\beta 7$ expression but did not affect CCR6 expression. Our data support a model in which HIV-specific CCR6⁺CD4⁺ T-cells escape the antiviral control of CD8⁺ T-cells in certain GALT sites (*e.g.*, Peyer's Patches) where migration is dependent on CCR6 [32,33,34] (Figure 7). Considering the critical role played by CCR6⁺ Th17 cells in mucosal immunity [66], uncontrolled HIV replication in these cells likely leads to dramatic alterations of mucosal immunity and microbial translocation [13,59,67,68,69]. These observations were made in a cohort of SP subjects with a median time since infection 16 years. Whether CD8⁺ T-cells colocalize in excess with CCR6⁺CD4⁺ T-cells for an efficient control of HIV replication in SP subjects during the first years of infection or in HIV-exposed uninfected individuals remains to be determined.

Our initial hypothesis was that the colocalization potential of CD8⁺ T-cells with CCR6⁺CD4⁺ T-cells was altered in HIV-infected subjects with disease progression but not in slow progressors (SP). To test this hypothesis, the expression of CCR6 was quantified on peripheral blood CD8⁺ and CD4⁺ T-cells from SP subjects and two other cohorts of HIV progressors, recently infected untreated (RI) and chronically infected under viral suppressive ART subjects (CI on ART). Unexpectedly, we found an alteration in the frequency of CCR6-expressing CD8⁺ and CD4⁺ T-cells in HIV-infected subjects regardless of their clinical characteristics of disease progression. This suggested the inability of CD8⁺ T-cells to be recruited in excess in the proximity of

CCR6⁺CD4⁺ T-cells, and this even in subjects with slow disease progression. This is consistent with studies reporting immunological alterations related to HIV persistence in CD4⁺ T-cells and chronic immune activation in SP subjects, especially after many years of infection in the absence of ART [23,24,70,71].

According to the paradigm of tissues-specific homing, effector memory T-cells are imprinted with the ability to recirculate into peripheral tissues where the initial antigen encounter took place [37,46,56,72]. A specific combination of adhesion molecules and chemokine receptors regulate the multi-step process of tissue-specific homing of T-cells [73,74]. Also, local presentation of antigens by endothelial cells contribute to the recruitment of T-cells into specific sites [75]. In this study, we demonstrated that HIV-specific CD154⁺CD4⁺ T-cells express molecules regulating migration into the GALT (integrin $\beta 7$, CCR6, CXCR3) and skin (CCR4). Considering the fact that the GALT [59,69] but not the skin are sites of HIV replication *in vivo*, this broad homing potential of HIV-specific CD154⁺CD4⁺ T-cells was unexpected and inconsistent with the paradigm of tissue-specific homing of pathogen-specific T-cells. This exception from the rule is not unique. In fact, T-cells induced upon subcutaneous yellow fever immunization have a dynamic migration program and home into multiple distal tissues, including the GALT [76].

CD154 was proposed as a surrogate marker for the identification of cytokine-producing T-cells in response to an antigenic stimulation [58]. However, we found a differential expression of homing molecules on recently activated CD154⁺ compared to proliferating CD4⁺ T-cells (CFSE^{low}) in response to HIV, SEB, or CMV. The skin-homing receptor CCR4 was highly expressed on CD154⁺ compared to CFSE^{low} CD4⁺ T-cells specific for HIV and CMV. This is consistent with the paradigm that T-cells are originally imprinted with a skin-homing potential that is lost during the process of differentiation into specialized Ag-specific cells [46]. Also, the expression of CCR6 was higher on CMV-specific CD154⁺ compared to CFSE^{low} CD4⁺ T-cells, while the integrin $\beta 7$ expression was lower on SEB-specific CD154⁺ compared to CFSE^{low} CD4⁺ T-cells. The finding that some antigens induced either CD154⁺ or CFSE^{low} CD4⁺ T-cells but not both suggests that CD154 expression does not predict the ability of a cell to proliferate. Accordingly, CD154⁺CD4⁺ T-cells were mainly triggered by HIV_{Nef} peptide pools, while CFSE^{low}CD4⁺ T-cells were selectively induced by HIV_{Gag} peptide pools (Table 4 and Table S1). Thus, HIV-specific CD154⁺ and CFSE^{low} CD4⁺ T-cells exhibit distinct homing potential and antigenic specificity and therefore may represent different stages of CD4⁺ T-cell differentiation with distinct roles in antiviral immunity. The molecular determinism underlying these differences remains unclear but might be related to the anatomic site of original antigenic priming.

The HIV establishes a persistent infection by mechanisms that are not clearly understood, and viral eradication is not achieved under current antiretroviral therapies [14,77]. The CD4⁺ T-cells play a critical role in HIV pathogenesis [77]. The HIV-specific compared to CMV-specific CD4⁺ T-cells are preferentially infected with HIV *in vivo* [49]. This is because HIV-specific CD4⁺ T-cells express high levels of the HIV coreceptor CCR5 [41] and produce low levels of CCR5 binding chemokines and therefore fail to protect themselves from infection in an autocrine manner [54]. Consistent with the evidence that the GALT is a major site of HIV replication [59,69], we observed that HIV-specific compared to CMV-specific CD154⁺CD4⁺ T-cells expressed at high levels both gut-homing molecules integrin $\beta 7$ and CCR6. We also observed increased expression of integrin $\beta 7$ and CCR6 on CD4⁺ T-cells proliferating in response to HIV

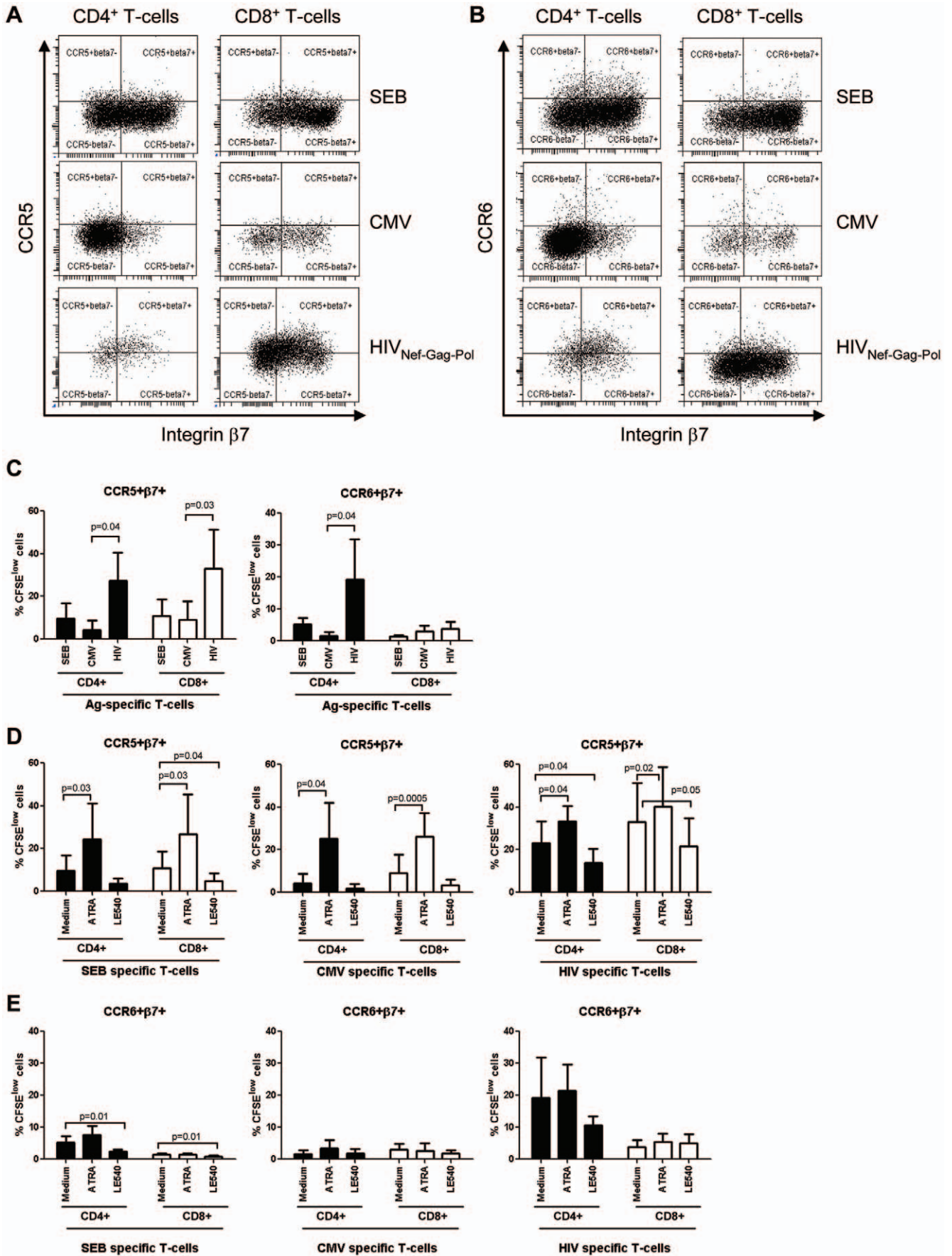


Figure 6. Retinoic acid upregulates the frequency of HIV-specific T-cells with a $\beta 7^+CCR5^+$ but not $\beta 7^+CCR6^+$ phenotype. PBMC from SP subjects were loaded in CFSE (0.5 μ M) and stimulated as in Figure 5. Cells were stained with a cocktail of fluorochrome-conjugated CD3, CD4, and integrin $\beta 7$, and CCR5 or CCR6 Abs. CFSE^{low} CD4⁺ and CD8⁺ T-cells specific for SEB, CMV, and HIV_{Nef-Gag-Pol} peptide pool were analyzed for the co-expression of (A) integrin $\beta 7$ and CCR5 and (B) integrin $\beta 7$ and CCR6. The effects of RA and LE540 on the frequency of Ag-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells exhibiting a $\beta 7^+CCR5^+$ or $\beta 7^+CCR6^+$ phenotype were then analyzed. (A–B) Shown are results from one representative SP subject and (C–E) statistical analysis of results from experiments performed with cells from five SP subjects (mean \pm SD). Paired t-Test p-values are indicated in the figures.
doi:10.1371/journal.pone.0032964.g006

compared to CMV antigens. In addition to their role in gut-homing, the integrin $\beta 7$ was identified as a new HIV-gp120 binding receptor [61,62], and its expression on HIV-specific CD4⁺ T-cells might favor HIV binding on these cells and viral dissemination from the portal sites of entry. The CCR6 is a marker for memory CD4⁺ T-cells with a Th17 and Th1Th17 lineage polarization profile [51]. We found that a small fraction of HIV-specific cells produced IL-17, with the majority of cells producing IFN- γ and TNF- α . Thus, HIV-specific CD4⁺ T-cells exhibit a Th1Th17 polarization profile. Indeed other studies demonstrated that very few HIV-specific CD4⁺ T-cells produce IL-17 [78]. Considering our previous findings that HIV replicates actively in T-cells with a Th1Th17 polarization profile [44], these results suggest that HIV-specific CD4⁺ T-cells in SP subjects are also permissive to infection. Consistent with this prediction, the expression of the HIV co-receptor CCR5 was relatively high on HIV-specific CD4⁺ T-cells from SP subjects. This may render them extremely permissive to infection and may explain why some of the SP subjects begin losing their CD4 counts, especially after many years of infection in the absence of ART [16]. Hence, the expression of integrin $\beta 7$, CCR6, and CCR5 represents a unique “signature” for HIV-specific T-cells. The relationship between imprinting for gut-homing and viral permissiveness was recently demonstrated for adenovirus serotype 5 (AD5)-specific CD4⁺ T-cells generated upon AD5-HIV vaccination (STEP trial), as cells exhibited an integrin $\alpha 4\beta 7^+CCR5^+$ phenotype and high susceptibility to HIV infection [79]. The molecular mechanisms that control homing potential of HIV-specific T-cells are likely related to the cellular/tissue environment in which these cells initially

encountered antigen. Indeed, the GALT dendritic cells produce RA, which is known to trigger integrin $\alpha 4\beta 7$ expression and upregulate CCR5 expression on T-cells [47,48,61]. Similarly, the GALT environment is rich in Th17 polarizing cytokines (TGF- β , IL-1, IL-6) [51,80,81] that may trigger CCR6 expression on HIV-specific CD4⁺ T-cells.

The CD8⁺ T-cells control HIV replication in target cells *via* cytotoxic and non-cytotoxic mechanisms [19,20,21]. Recent studies using visualization techniques demonstrated that recruitment of excess viral-specific effectors in the vicinity of target cells is critical for the control of viral replication and disease progression in an SIV model of infection [29]. Our results reveal that matched HIV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T-cells may colocalize to anatomic sites where recruitment is mediated by integrin $\beta 7$, CXCR3 and/or CCR5 (Figure 7A). The expression of integrin $\beta 7$ on both HIV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T-cells supports the idea that these cells are primed with the antigen within the GALT, where they are likely exposed to factors that imprint cells with a gut-homing potential [46,47]. The CXCR3 is responsible for leukocyte migration into the inflammatory sites, including the gut [56]. Of note, a decreased frequency of CXCR3⁺CD8⁺ T-cells was reported in advanced HIV-1 infection that might contribute to cytotoxic T-lymphocyte dysfunction [82]. In our SP cohort, HIV-specific T-cells expressed maximal levels of CXCR3, and this suggests their functional competence *in vivo*. In contrast, we observed that CCR6 was expressed at high levels on HIV-specific CD4⁺ but not CD8⁺ T-cells. The low expression of CCR6 on HIV-specific CD8⁺ T-cells was consistent with the decreased frequency of memory CCR6⁺CD8⁺ T-cells in the peripheral blood

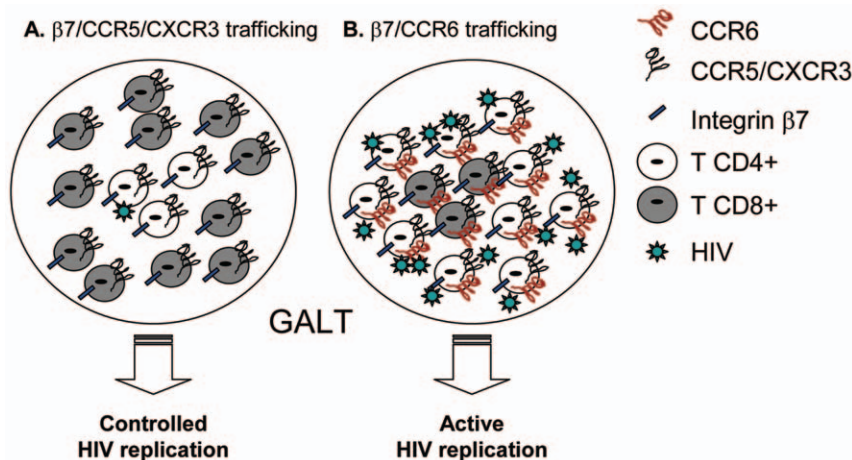


Figure 7. Proposed model for the differential colocalization of HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells into the GALT. The control of viral replication is dependent on the *in situ* colocalization of excess effector *versus* target cells [28]. Given the results included in Figures 1–6 of the present manuscript, we propose a model where (A) HIV replication in CD4⁺ T-cells may be controlled by CD8⁺ T-cells in certain GALT sites (e.g., lamina propria), where recruitment is dependent on integrin $\beta 7$, CXCR3 and CCR5 because of an increased ratio between HIV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T-cells. In contrast, (B) HIV-specific CD4⁺ T-cells recruited into other GALT sites *via* CCR6 (e.g., Peyer’s Patches) may escape the CD8⁺ T-cell-mediated antiviral control due to a limited CCR6-dependent colocalization potential of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells. This model is in line with our previous findings that CCR6⁺CD4⁺ T-cells harbor the highest levels of integrated HIV-DNA *in vivo* [44] and suggests that novel therapeutic strategies aimed at increasing CCR6 expression on CD8⁺ T-cells may lead to a better control of HIV replication in CCR6⁺CD4⁺ T-cells.
doi:10.1371/journal.pone.0032964.g007

of HIV-infected subjects with slow and rapid disease progression compared to uninfected individuals. This points to the fact that regardless of the clinical characteristics of HIV disease progression, CD8⁺ T-cells have a limited ability to colocalize with CCR6⁺CD4⁺ T-cells and therefore to control HIV replication in these cells. This may explain in part why CCR6⁺CD4⁺ T-cells are highly permissive to HIV-DNA integration *in vivo* [44]. The escape of CCR6⁺CD4⁺ T-cells from the non-cytotoxic antiviral control by CD8⁺ T-cells may also explain the preferential depletion of these cells during disease progression [44], likely *via* a virus-induced toxicity mechanism [83].

Several previous studies demonstrated that HIV-specific CD8⁺ T cells from SP subjects are efficient in controlling viral replication *ex vivo* [15,16,19]. This is consistent with our observations *in vitro* that HIV replication in antigen-stimulated PBMC from the seven SP subjects was controlled (undetectable HIV-p24 levels, as quantified by ELISA), likely by CD8⁺ T-cells (Ancuta, unpublished observations). However, the situation *in vivo* may be different. Our results support a model in which the low expression of CCR6 on HIV-specific CD8⁺ T-cells is exploited by HIV-1 for its efficient replication in CCR6⁺CD4⁺ T-cells in some GALT sites such as the Peyer's Patches (Figure 7B). In this context, it is of interest to identify ways to increase the ability of HIV-specific CD8⁺ T-cell to colocalize with HIV-specific CD4⁺ T-cells. We found that RA increased the expression of integrin β 7 on T-cells specific for HIV, CMV and SEB and the frequency of T-cells specific for CMV and SEB with a β 7⁺CCR5⁺ phenotype. The HIV-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cells included a relatively high fractions of β 7⁺CCR5⁺, and their frequency remained high upon RA treatment. In contrast, HIV-specific CD4⁺ compared to CD8⁺ T-cells included an increased frequency of cells with a β 7⁺CCR6⁺ phenotype and the physiological dose of RA used (10 nM, [61,63]) did not upregulate CCR6 expression on CD8⁺ nor CD4⁺ T-cells. Other factors responsible for Th17 differentiation, such as TGF- β , IL-1, IL-6 [51,80,81], might be involved in regulating CCR6 expression on HIV-specific CD8⁺ T-cells and remain to be identified.

Together, these results suggest the ability of HIV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T-cells to colocalize into the GALT (*e.g.*, lamina propria) *via* integrin β 7, CCR5, and CXCR3 and reveal a limited potential of HIV-specific CD8⁺ T-cells to migrate into other GALT sites (*e.g.*, Peyer's Patches), where recruitment is dependent on CCR6 [32,33,34]. Studies on gut biopsies are required to validate our proposed model (Figure 7), which is consistent with the preferential permissiveness of CCR6⁺CD4⁺ T-cells to HIV infection *in vivo* [44]. In this context, understanding molecular mechanisms regulating CCR6 expression on HIV-specific CD8⁺ T-cells, together with the expression of the CCR6 ligands into the GALT, is of paramount importance for the design of new therapeutic strategies aimed at HIV eradication. However, caution must be taken when designing such strategies to avoid an increased recruitment of HIV targets at the portal sites of mucosal entry. Finally, studies evaluating the functionality of the immune system in response to ART and vaccination may gain in physiological relevance if they consider monitoring the *in situ* colocalization potential of HIV-specific CD8⁺ and CD4⁺ T-cells as a new correlate of protection.

Supporting Information

Figure S1 The HIV-specific versus CMV-specific CD154⁺CD4⁺ T-cells preferentially express a gut-homing potential. PBMC from SP subjects were stimulated with different HIV Nef, Gag, Pol peptide pools (10 μ g/ml), recombinant HIV-

p24 protein (5 μ g/ml), SEB (1 μ g/ml), or CMV-pp65 peptide pool (5 μ g/ml) for 18 hours at 37°C in the presence of fluorescence conjugated anti-CD154-PE/Cy5 Abs (20 μ l/2 \times 10⁶ cells/0.2 ml/well). Antigen-specific T-cells were identified as CD154⁺ cells, as previously described [58]. Cells were harvested, stained with a cocktail of fluorochrome-conjugated CD3, CD4, and β 7 integrin, CCR6, CXCR3, or CCR4 Abs and analyzed by polychromatic flow cytometry for (A) the expression of CD154 on CD3⁺CD4⁺ T-cells and (B–D) the expression of homing molecules on CD3⁺CD4⁺CD154⁺ T-cells. (A–B) Shown are results from one SP subjects (SP 015 stimulated with the HIV Nef₅₁₆₄₋₅₁₈₇ peptide pool), representative of results generated with cells from five different donors. (C) The expression (%) of homing receptors was analyzed on CD154⁺ T-cells specific for SEB, CMV, and different HIV peptide pools in five different SP subjects. (D) Shown are statistical analyses of the homing molecule expression on CD154⁺CD4⁺ T-cells specific for SEB, CMV, and HIV (all peptide pools) in five different SP subjects (box & whisker graph: range and median). Mann-Whitney p-values are indicated in the figures.

(TIF)

Figure S2 Homing potential of CD4⁺ and CD8⁺ T-cells proliferating in response to HIV peptides. PBMC from SP subjects were stimulated with different antigens and analyzed by polychromatic flow cytometry for the expression of homing molecules as in Figures 2 and 3. Shown are statistical analyses of the homing molecule expression on (A) CFSE^{low}CD4⁺ and (B) CFSE^{low}CD8⁺ T-cells specific for SEB, CMV, and HIV (all peptide pools) in five different SP subjects (box & whisker graph: range and median). Mann-Whitney p-values are indicated in the figures. (C) Shown are statistical analyses of the integrin β 7 and CXCR3 co-expression on matched CD4⁺ and CD8⁺ T-cells proliferating (CFSE^{low}) in response to CMV *versus* HIV_{NefGagPol} peptide pool in four different SP subjects. Paired T-test p-values are indicated in the figures.

(TIF)

Figure S3 The HIV-specific CD4⁺ T-cells exhibit a Th1Th17 polarization profile. PBMCs from SP subjects were loaded in CFSE (0.5 μ M) and stimulated with different HIV Nef, Gag, Pol peptide pools (500 ng/ml), recombinant HIV-p24 (5 μ g/ml), SEB (25 ng/ml), a peptide pool spanning the CMV pp65 protein (1 μ g/ml), or *C. albicans hyphae* (25 μ l of protein lysate) for 5 days at 37°C and further stimulated with PMA (50 ng/ml) and Ionomycin (1 μ g/ml) in the presence of Brefeldin A (10 μ g/ml) for 18 hours at 37°C. Cells were stained on the surface with CD3 and CD8 Abs as well as intracellularly with IFN- γ , TNF- α , and IL-17 Abs and then analyzed by polychromatic flow cytometry for the expression of cytokines in CD3⁺CD8⁻ (referred as CD4⁺ T-cells) cells. Shown is (A) the gating strategy for CD4⁺ T-cells identification and (B) representative dot plots of IFN- γ , TNF- α , and IL-17 production by HIV-specific and *C. albicans*-specific CD4⁺ T-cells. (C) Shown is the intracellular expression of cytokines by CFSE^{low}CD4⁺ T-cells specific for SEB, CMV, *C. albicans*, and different HIV peptide pools in five different SP subjects.

(TIF)

Table S1 Screening for HIV-1 specific CD4⁺ T-cells responses using the CD154 co-culture assay. To identify antigen-specific CD4⁺ T-cells, the CD154/CD40L assay was performed as previously described (89). To this aim, PBMC from five HIV-infected SP subjects were stimulated with SEB (1 μ g/ml), CMV-pp65 peptide pool (5 μ g/ml), recombinant HIV-p24 protein (5 μ g/ml), or HIV peptide pools (10 μ g/ml) in the

presence of anti-CD154-PE/Cy5 Abs (20 μ l/well) and monensin (2 μ M) for 16 hrs at 37°C. Cells were then harvested, stained for surface markers with fluorescence-conjugated Abs against CD3, CD4, integrin β 7, CCR6, CXCR3, and CCR4, and analyzed by flow cytometry for the expression of homing markers on CD3⁺CD4⁺CD154⁺ T-cells. Results are expressed as % of CD4⁺CD154⁺ T-cells. Values included in the table were >1.5-fold higher than the background CD154 expression observed for cells cultured in the absence of antigen.

(DOC)

Acknowledgments

The authors thank Laurence Lejeune (Flow Cytometry Core Facility, CHUM-Research Center, Saint-Luc Hospital, Montréal, QC, Canada) for

References

- Barre-Sinoussi F (2010) HIV: a discovery opening the road to novel scientific knowledge and global health improvement. *Virology* 397: 255–259.
- Brenchley JM, Price DA, Douek DC (2006) HIV disease: fallout from a mucosal catastrophe? *Nat Immunol* 7: 235–239.
- Lackner AA, Mohan M, Veazey RS (2009) The gastrointestinal tract and AIDS pathogenesis. *Gastroenterology* 136: 1965–1978.
- Brenchley JM, Schacker TW, Ruff LE, Price DA, Taylor JH, et al. (2004) CD4+ T cell depletion during all stages of HIV disease occurs predominantly in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 749–759.
- Mehandru S, Poles MA, Tenner-Racz K, Horowitz A, Hurley A, et al. (2004) Primary HIV-1 infection is associated with preferential depletion of CD4+ T lymphocytes from effector sites in the gastrointestinal tract. *J Exp Med* 200: 761–770.
- Li Q, Duan L, Estes JD, Ma ZM, Rourke T, et al. (2005) Peak SIV replication in resting memory CD4+ T cells depletes gut lamina propria CD4+ T cells. *Nature* 434: 1148–1152.
- Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martin M, et al. (2005) Massive infection and loss of memory CD4+ T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature* 434: 1093–1097.
- Veazey RS, Lackner AA (2004) Getting to the guts of HIV pathogenesis. *J Exp Med* 200: 697–700.
- Lackner AA, Veazey RS (2007) Current concepts in AIDS pathogenesis: insights from the SIV/macaque model. *Annu Rev Med* 58: 461–476.
- Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, et al. (2006) Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med* 12: 1365–1371.
- Ancuta P, Kamat A, Kunstman KJ, Kim EY, Autissier P, et al. (2008) Microbial translocation is associated with increased monocyte activation and dementia in AIDS patients. *PLoS ONE* 3: e2516.
- Sheth PM, Chege D, Shin LY, Huibner S, Yue FY, et al. (2008) Immune reconstitution in the sigmoid colon after long-term HIV therapy. *Mucosal Immunol* 1: 382–388.
- Macal M, Sankaran S, Chun TW, Reay E, Flamm J, et al. (2008) Effective CD4+ T-cell restoration in gut-associated lymphoid tissue of HIV-infected patients is associated with enhanced Th17 cells and polyfunctional HIV-specific T-cell responses. *Mucosal Immunol* 1: 475–488.
- Trono D, Van Lint C, Rouzioux C, Verdin E, Barre-Sinoussi F, et al. (2010) HIV persistence and the prospect of long-term drug-free remissions for HIV-infected individuals. *Science* 329: 174–180.
- Deeks SG, Walker BD (2007) Human immunodeficiency virus controllers: mechanisms of durable virus control in the absence of antiretroviral therapy. *Immunity* 27: 406–416.
- Migueles SA, Connors M (2010) Long-term nonprogressive disease among untreated HIV-infected individuals: clinical implications of understanding immune control of HIV. *JAMA* 304: 194–201.
- Pereyra F, Jia X, McLaren PJ, Telenti A, de Bakker PI, et al. (2010) The major genetic determinants of HIV-1 control affect HLA class I peptide presentation. *Science* 330: 1551–1557.
- Bashirova AA, Thomas R, Carrington M (2011) HLA/KIR restraint of HIV: surviving the fittest. *Annu Rev Immunol* 29: 295–317.
- Saez-Cirion A, Pancino G, Sinet M, Venet A, Lambotte O (2007) HIV controllers: how do they tame the virus? *Trends Immunol* 28: 532–540.
- Migueles SA, Osborne CM, Royce C, Compton AA, Joshi RP, et al. (2008) Lytic granule loading of CD8+ T cells is required for HIV-infected cell elimination associated with immune control. *Immunity* 29: 1009–1021.
- Killian MS, Johnson C, Teque F, Fujimura S, Levy JA (2011) Natural suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication is mediated by transitional memory CD8+ T cells. *J Virol* 85: 1696–1705.
- Hatano H, Delwart EL, Norris PJ, Lee TH, Dunn-Williams J, et al. (2009) Evidence for persistent low-level viremia in individuals who control human immunodeficiency virus in the absence of antiretroviral therapy. *J Virol* 83: 329–335.
- Hunt PW, Hatano H, Sinclair E, Lee TH, Busch MP, et al. (2011) HIV-specific CD4+ T cells may contribute to viral persistence in HIV controllers. *Clin Infect Dis* 52: 681–687.
- Sankaran S, Guadalupe M, Reay E, George MD, Flamm J, et al. (2005) Gut mucosal T cell responses and gene expression correlate with protection against disease in long-term HIV-1-infected nonprogressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 9860–9865.
- Kaul R, Plummer FA, Kimani J, Dong T, Kiama P, et al. (2000) HIV-1-specific mucosal CD8+ lymphocyte responses in the cervix of HIV-1-resistant prostitutes in Nairobi. *J Immunol* 164: 1602–1611.
- Goonetilleke N, Liu MK, Salazar-Gonzalez JF, Ferrari G, Giorgi E, et al. (2009) The first T cell response to transmitted/founder virus contributes to the control of acute viremia in HIV-1 infection. *J Exp Med* 206: 1253–1272.
- Salazar-Gonzalez JF, Salazar MG, Keele BF, Learn GH, Giorgi EE, et al. (2009) Genetic identity, biological phenotype, and evolutionary pathways of transmitted/founder viruses in acute and early HIV-1 infection. *J Exp Med* 206: 1273–1289.
- Haase AT (2011) Early events in sexual transmission of HIV and SIV and opportunities for interventions. *Annu Rev Med* 62: 127–139.
- Li Q, Skinner PJ, Ha SJ, Duan L, Mattila TL, et al. (2009) Visualizing antigen-specific and infected cells in situ predicts outcomes in early viral infection. *Science* 323: 1726–1729.
- Berlin C, Berg EL, Briskin MJ, Andrew DP, Kilshaw PJ, et al. (1993) Alpha 4 beta 7 integrin mediates lymphocyte binding to the mucosal vascular addressin MAdCAM-1. *Cell* 74: 185–185.
- Agace WW (2008) T-cell recruitment to the intestinal mucosa. *Trends Immunol* 29: 514–522.
- Kunkel EJ, Campbell DJ, Butcher EC (2003) Chemokines in lymphocyte trafficking and intestinal immunity. *Microcirculation* 10: 313–323.
- Westphal S, Luger A, von Wedel J, von Eiff C, Maaser C, et al. (2008) Resistance of chemokine receptor 6-deficient mice to yersinia enterocolitica infection: evidence of defective m-cell formation in vivo. *Am J Pathol* 172: 671–680.
- Wang C, Kang SG, Lee J, Sun Z, Kim CH (2009) The roles of CCR6 in migration of Th17 cells and regulation of effector T-cell balance in the gut. *Mucosal Immunol* 2: 173–183.
- Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y, Kagechika H, Kato C, et al. (2004) Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* 21: 527–538.
- Stenstad H, Ericsson A, Johansson-Lindbom B, Svensson M, Marsal J, et al. (2006) Gut-associated lymphoid tissue-primed CD4+ T cells display CCR9-dependent and -independent homing to the small intestine. *Blood* 107: 3447–3454.
- Sigmundsdottir H, Butcher EC (2008) Environmental cues, dendritic cells and the programming of tissue-selective lymphocyte trafficking. *Nat Immunol* 9: 981–987.
- Olsson J, Poles M, Spetz AL, Elliott J, Hultin L, et al. (2000) Human immunodeficiency virus type 1 infection is associated with significant mucosal inflammation characterized by increased expression of CCR5, CXCR4, and beta-chemokines. *J Infect Dis* 182: 1625–1635.
- Dwinell MB, Luger N, Eckmann L, Kagnoff MF (2001) Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 120: 49–59.
- Zaunders JJ, Ip S, Mumier ML, Kaufmann DE, Suzuki K, et al. (2006) Infection of CD127+ (interleukin-7 receptor+) CD4+ cells and overexpression of CTLA-4 are linked to loss of antigen-specific CD4+ T cells during primary human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 80: 10162–10172.
- Zaunders JJ, Mumier ML, Kaufmann DE, Ip S, Grey P, et al. (2005) Early proliferation of CCR5(+) CD38(+++) antigen-specific CD4(+) Th1 effector cells during primary HIV-1 infection. *Blood* 106: 1660–1667.
- Shacklett BL, Cox CA, Sandberg JK, Stollman NH, Jacobson MA, et al. (2003) Trafficking of human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T cells to gut-associated lymphoid tissue during chronic infection. *J Virol* 77: 5621–5631.

43. Lecureuil C, Combadiere B, Mazoyer E, Bonduelle O, Samri A, et al. (2007) Trapping and apoptosis of novel subsets of memory T lymphocytes expressing CCR6 in the spleen of HIV-infected patients. *Blood* 109: 3649–3657.
44. Gosselin A, Monteiro P, Chomont N, Diaz-Griffero F, Said EA, et al. (2010) Peripheral blood CCR4+ CCR6+ and CXCR3+ CCR6+ CD4+ T cells are highly permissive to HIV-1 infection. *J Immunol* 184: 1604–1616.
45. El Hed A, Khaitan A, Kozhaya L, Manel N, Daskalakis D, et al. (2010) Susceptibility of human Th17 cells to human immunodeficiency virus and their perturbation during infection. *J Infect Dis* 201: 843–854.
46. Mora JR, von Andrian UH (2004) Retinoic acid: an educational “vitamin elixir” for gut-seeking T cells. *Immunity* 21: 458–460.
47. Manicassamy S, Pulendran B (2009) Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages. *Semin Immunol* 21: 22–27.
48. Monteiro P, Gosselin A, Wacleche VS, El-Far M, Said EA, et al. (2011) Memory CCR6+CD4+ T cells are preferential targets for productive HIV type 1 infection regardless of their expression of integrin beta7. *J Immunol* 186: 4618–4630.
49. Douek DC, Brenchley JM, Betts MR, Ambrozak DR, Hill BJ, et al. (2002) HIV preferentially infects HIV-specific CD4+ T cells. *Nature* 417: 95–98.
50. Boulassel MR, Spurril G, Rouleau D, Tremblay C, Edwardes M, et al. (2003) Changes in immunological and virological parameters in HIV-1 infected subjects following leukapheresis. *J Clin Apher* 18: 55–60.
51. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, Jarrossay D, Gattorno M, et al. (2007) Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 8: 639–646.
52. Younes SA, Yassine-Diab B, Dumont AR, Boulassel MR, Grossman Z, et al. (2003) HIV-1 viremia prevents the establishment of interleukin 2-producing HIV-specific memory CD4+ T cells endowed with proliferative capacity. *J Exp Med* 198: 1909–1922.
53. Levy JA (2003) The search for the CD8+ cell anti-HIV factor (CAF). *Trends Immunol* 24: 628–632.
54. Casazza JP, Brenchley JM, Hill BJ, Ayana R, Ambrozak D, et al. (2009) Autocrine production of beta-chemokines protects CMV-Specific CD4 T cells from HIV infection. *PLoS Pathog* 5: e1000646.
55. Williams IR (2006) CCR6 and CCL20: partners in intestinal immunity and lymphorganogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1072: 52–61.
56. Woodland DL, Kohlmeier JE (2009) Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol* 9: 153–161.
57. Reiss Y, Proudfoot AE, Power CA, Campbell JJ, Butcher EC (2001) CC chemokine receptor (CCR)4 and the CCR10 ligand cutaneous T cell-attracting chemokine (CTACK) in lymphocyte trafficking to inflamed skin. *J Exp Med* 194: 1541–1547.
58. Chattopadhyay PK, Yu J, Roederer M (2005) A live-cell assay to detect antigen-specific CD4+ T cells with diverse cytokine profiles. *Nat Med* 11: 1113–1117.
59. Brenchley JM, Douek DC (2008) HIV infection and the gastrointestinal immune system. *Mucosal Immunol* 1: 23–30.
60. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, et al. (2007) Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med* 204: 1849–1861.
61. Arthos J, Cicala C, Martinelli E, Macleod K, Van Ryk D, et al. (2008) HIV-1 envelope protein binds to and signals through integrin alpha4beta7, the gut mucosal homing receptor for peripheral T cells. *Nat Immunol* 9: 301–309.
62. Cicala C, Martinelli E, McNally JP, Goode DJ, Gopaul R, et al. (2009) The integrin alpha4beta7 forms a complex with cell-surface CD4 and defines a T-cell subset that is highly susceptible to infection by HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 20877–20882.
63. Napoli JL (1986) Quantification of physiological levels of retinoic acid. *Methods Enzymol* 123: 112–124.
64. Manicassamy S, Ravindran R, Deng J, Oluoch H, Denning TL, et al. (2009) Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. *Nat Med* 15: 401–409.
65. Haase AT (2010) Targeting early infection to prevent HIV-1 mucosal transmission. *Nature* 464: 217–223.
66. Ancuta P, Monteiro P, Sekaly RP (2010) Th17 lineage commitment and HIV-1 pathogenesis. *Curr Opin HIV AIDS* 5: 158–165.
67. Brenchley JM, Paiardini M, Knox KS, Asher AI, Cervasi B, et al. (2008) Differential Th17 CD4 T-cell depletion in pathogenic and nonpathogenic lentiviral infections. *Blood* 112: 2826–2835.
68. Raffatellu M, Santos RL, Verhoeven DE, George MD, Wilson RP, et al. (2008) Simian immunodeficiency virus-induced mucosal interleukin-17 deficiency promotes Salmonella dissemination from the gut. *Nat Med* 14: 421–428.
69. Douek DC, Roederer M, Koup RA (2009) Emerging concepts in the immunopathogenesis of AIDS. *Annu Rev Med* 60: 471–484.
70. Hunt PW, Brenchley J, Sinclair E, McCune JM, Roland M, et al. (2008) Relationship between T cell activation and CD4+ T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J Infect Dis* 197: 126–133.
71. Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Pauchard M, Ait-Mohand H, et al. (2011) HIV disease progression despite suppression of viral replication is associated with exhaustion of lymphopoiesis. *Blood* 117: 5142–5151.
72. Sallusto F, Mackay CR (2004) Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. *Curr Opin Immunol* 16: 724–731.
73. Butcher EC, Picker LJ (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272: 60–66.
74. Lusinkas FW, Lim YC, Lichtman AH (2001) Wall shear stress: the missing step for T cell transmigration? *Nat Immunol* 2: 478–480.
75. Marelli-Berg FM, Cannella L, Dazzi F, Mirenda V (2008) The highway code of T cell trafficking. *J Pathol* 214: 179–189.
76. Masopust D, Choo D, Vezys V, Wherry EJ, Duraiswamy J, et al. (2010) Dynamic T cell migration program provides resident memory within intestinal epithelium. *J Exp Med* 207: 553–564.
77. Chomont N, Dafonseca S, Vandergeeten C, Ancuta P, Sekaly RP (2011) Maintenance of CD4+ T-cell memory and HIV persistence: keeping memory, keeping HIV. *Curr Opin HIV AIDS* 6: 30–36.
78. Yue FY, Merchant A, Kovacs CM, Loutfy M, Persad D, et al. (2008) Virus-specific interleukin-17-producing CD4+ T cells are detectable in early human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 82: 6767–6771.
79. Benlahrech A, Harris J, Meiser A, Papagatsias T, Hornig J, et al. (2009) Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 19940–19945.
80. Manel N, Unutmaz D, Littman DR (2008) The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat Immunol* 9: 641–649.
81. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, McKenzie BS, Blumenschein WM, et al. (2007) Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 8: 950–957.
82. Brainard DM, Tager AM, Misdraji J, Frahm N, Lichterfeld M, et al. (2007) Decreased CXCR3+ CD8 T cells in advanced human immunodeficiency virus infection suggest that a homing defect contributes to cytotoxic T-lymphocyte dysfunction. *J Virol* 81: 8439–8450.
83. Doitsh G, Cavrois M, Lassen KG, Zepeda O, Yang Z, et al. (2010) Abortive HIV infection mediates CD4 T cell depletion and inflammation in human lymphoid tissue. *Cell* 143: 789–801.

Altered Immune Response Differentially Enhances Susceptibility to *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* Infection in Mice Expressing the HIV-1 Transgene

Kassandre Leongson,^a Vincent Cousineau-Côté,^a Mathieu Goupil,^a Francine Aumont,^a Serge Sénéchal,^a Louis Gaboury,^b Paul Jolicoeur,^{a,c,d} James W. Kronstad,^e Louis de Repentigny^a

Departments of Microbiology and Immunology^a and Pathology and Cell Biology,^b Faculty of Medicine, University of Montreal, Laboratory of Molecular Biology, Clinical Research Institute of Montreal,^c and Division of Experimental Medicine, McGill University,^d Montreal, Quebec, Canada; The Michael Smith Laboratories, Department of Microbiology and Immunology, University of British Columbia, Vancouver, British Columbia, Canada^e

Cryptococcus neoformans var. *grubii* is the most frequent cause of AIDS-associated cryptococcosis worldwide, while *Cryptococcus gattii* usually infects immunocompetent people. To understand the mechanisms which cause differential susceptibility to these cryptococcal species in HIV infection, we established and characterized a model of cryptococcosis in CD4C/HIV^{MutA} transgenic (Tg) mice expressing gene products of HIV-1 and developing an AIDS-like disease. Tg mice infected intranasally with *C. neoformans* var. *grubii* strain H99 or C23 consistently displayed reduced survival compared to non-Tg mice at three graded inocula, while shortened survival of Tg mice infected with *C. gattii* strain R265 or R272 was restricted to a single high inoculum. HIV-1 transgene expression selectively augmented systemic dissemination to the liver and spleen for strains H99 and C23 but not strains R265 and R272. Histopathologic examination of lungs of Tg mice revealed large numbers of widely scattered H99 cells, with a minimal inflammatory cell response, while in the non-Tg mice H99 was almost completely embedded within extensive mixed inflammatory cell infiltrates. In contrast to H99, R265 was dispersed throughout the lung parenchyma and failed to induce a strong inflammatory response in both Tg and non-Tg mice. HIV-1 transgene expression reduced pulmonary production of CCL2 and CCL5 after infection with H99 or R265, and production of these two chemokines was lower after infection with R265. These results indicate that an altered immune response in these Tg mice markedly enhances *C. neoformans* but not *C. gattii* infection. This model therefore provides a powerful new tool to further investigate the immunopathogenesis of cryptococcosis.

Cryptococcal meningitis is one of the most important HIV-related opportunistic infections worldwide, especially in sub-Saharan Africa (1). Globally, approximately 957,900 cases occur each year, resulting in 624,700 deaths among persons living with HIV/AIDS (1). Although cryptococcosis can occur in apparently healthy hosts, most infections are observed in HIV-infected patients, who are particularly susceptible to this life-threatening fungal infection (1). Inhalation of basidiospores or yeast cells of *Cryptococcus* from the environment results in pulmonary infection and preferential dissemination to the central nervous system, causing meningoencephalitis. *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) is by far the most frequent cause of AIDS-associated cryptococcosis worldwide, with fewer cases caused by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotype D), *Cryptococcus gattii* (serotypes B and C) (2–7), or, exceptionally, a *C. neoformans* var. *grubii* serotype A × *C. gattii* serotype B hybrid (8, 9). In contrast to *C. neoformans* var. *grubii*, *C. gattii* usually infects immunocompetent people (10) and is only occasionally found in patients with HIV/AIDS (2–6). In a survey from South Africa, however, although only 2.4% of all *Cryptococcus* isolates were confirmed to be *C. gattii*, 24 of these cases occurred in HIV-infected patients, and only a single case involved an HIV-uninfected person (6). Accordingly, although HIV/AIDS may potentially augment susceptibility to *C. gattii* infection in specific circumstances combining both environmental exposure in an area of endemicity and limited access to antiretroviral therapy, most of the enhanced burden of cryptococcal infection in HIV/AIDS is caused by the ubiquitous *C. neoformans* var. *grubii* (6).

A major endemic outbreak of *C. gattii* infection that began on

Vancouver Island in 1999 led to 239 reported cases and at least 19 deaths by the end of 2008 (10–12; www.BCCDC.ca), and it has now spread to mainland British Columbia and the Pacific Northwest in the United States (10, 13–15). Consistent with the epidemiology of *C. gattii* infections in Australia and New Zealand (7, 16), these infections in the British Columbia outbreak occurred mainly in immunocompetent people, and only 6.2% of confirmed *C. gattii*-infected patients were infected with HIV (12).

The mechanisms underlying the differential ability of *C. gattii* and *C. neoformans* var. *grubii* to cause disease in healthy persons or patients with HIV/AIDS are largely unknown. As a first step toward understanding the ability of *C. gattii* to cause disease in immunocompetent hosts, a previous study revealed reduced levels of neutrophil infiltration and reduced inflammatory cytokine production in the lungs of C57BL/6 mice infected with *C. gattii* com-

Received 26 November 2012 Returned for modification 15 December 2012

Accepted 12 January 2013

Published ahead of print 22 January 2013

Editor: G. S. Deepe, Jr.

Address correspondence to Louis de Repentigny

K.L. and V.C.-C. contributed equally to this article.

Supplemental material for this article may be found at <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01339-12>.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/IAI.01339-12

pared to those of mice infected with *C. neoformans* var. *grubii* (17). However, a comprehensive analysis of virulence and host immune cell responses to these *Cryptococcus* species would be facilitated greatly by the availability of a relevant animal model of cryptococcosis in HIV infection. We previously devised a novel model of mucosal candidiasis in CD4C/HIV transgenic (Tg) mice expressing gene products of HIV-1 in immune cells and developing an AIDS-like disease (18). These CD4C/HIV Tg mice are immunodeficient and exhibit severe atrophy and fibrosis of lymphoid organs and a preferential depletion of CD4⁺ T cells, with altered CD4⁺ T-cell proliferation *in vitro*, loss of CD4⁺ T-cell help, CD4⁺ T-cell and B-cell activation, and impaired dendritic cell (DC) function (19–23). In addition, diseases of the lung (lymphocytic interstitial pneumonitis), heart (myocytolysis and myocarditis), and kidney (tubulointerstitial nephritis, segmental glomerulosclerosis, and microcystic dilatation) develop in these Tg mice (19, 24). Mucosal *Candida* infection in these Tg mice closely mimics the clinical and pathological features of candidal infection in human HIV infection (18, 25) and has allowed us to perform controlled studies on the immunopathogenesis of mucosal candidiasis in HIV infection (26–28).

With the recognition that a cause-and-effect analysis of the immunopathogenesis of cryptococcosis and the virulence of *Cryptococcus* species could potentially be achieved with these Tg mice, the present study was undertaken to establish and characterize a novel model of cryptococcosis in these animals and to examine the infections caused by *C. neoformans* var. *grubii* and *C. gattii*, using survival assays, organ fungal burdens, histopathology, and assessments of the host immune response during a time course of infection.

MATERIALS AND METHODS

Strains. *C. neoformans* var. *grubii* strains H99 and C23 and *C. gattii* strains R265 and R272 were used in this study. Clinical strains H99 and C23, both of molecular type VNI (29), were obtained from Joseph Heitman and Thomas Mitchell (Duke University Medical Center). R265 and R272 were both isolated in 2001 from the bronchial washings of immunocompetent patients infected during the outbreak on Vancouver Island and belong to the major VGIIa and less frequent VGIIb molecular types of *C. gattii* causing this outbreak, respectively (11).

Infection of Tg mice expressing HIV-1. CD4C/HIV^{MutA} Tg mice have been described elsewhere (19). CD4C/HIV^{MutA} mutant DNA harbors mouse CD4 enhancer and human CD4 promoter elements to drive expression of the *nef*, *env*, and *rev* genes of HIV-1 in CD4⁺ CD8⁺ and CD4⁺ thymocytes, peripheral CD4⁺ T cells, macrophages, and DCs. The founder mouse F21388 was bred on the C3H background. Animals from this line express moderate levels of the transgene, with 50% survival at 3 months (19). Several HIV-1 genes (*gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, and *vpu*) are mutated in the CD4C/HIV^{MutA} DNA, whereas *nef*, *env*, and *rev* are intact. Specific-pathogen-free male and female Tg mice and non-Tg littermates were housed in sterilized individual cages equipped with filter hoods, supplied with sterile water, and fed with sterile mouse chow. All animal experiments were approved by the animal care committee of the University of Montreal.

Cryptococcus strains were grown in yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium for 24 h at 30°C, washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), counted in a hemacytometer, and resuspended in PBS at a density of 2.5×10^6 or 2.5×10^5 yeast cells/ml. Intranasal inoculation of the mice was performed as described previously (17). For the survival assay, animals reaching predetermined morbidity endpoints (>20% weight loss, immobile, no response when stimulated, or irregular/labored abdominal respiration) were designated premortem and euthanized with a lethal dose of ketamine and xylazine (18). For all other assays, mice were

euthanized on the indicated days. Quantification of *Cryptococcus* in internal organs, histopathology, and determination of *Cryptococcus* cell body diameters and capsule thicknesses in mucicarmine-stained tissue sections were done using methods described elsewhere (17, 18, 30).

Flow cytometry analysis of lung immune cell populations. Groups of five CD4C/HIV^{MutA} Tg and non-Tg littermates (42 to 69 days old) were infected intranasally with 1.25×10^4 CFU of *C. neoformans* H99 or 1.25×10^5 CFU of *C. gattii* R265 and assessed at 7 and 14 days postinfection. Uninfected control mice received intranasal PBS alone. Independent experiments were conducted by pooling cells from all mice within each group. Mice were anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine and then exsanguinated with 0.9% NaCl. Single-cell suspensions of lung tissue were prepared by mechanical disruption in a mortar containing 3 ml of PBS and incubation at 37°C for 1 h with 1% collagenase type IV (Sigma) in RPMI 1640 medium (Wisent Inc., St. Bruno, Canada) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Wisent), 100 U/ml penicillin-streptomycin, and 50 µg/ml gentamicin. Cells were filtered through a sterile nylon mesh (pore size, 80 µm) to obtain a homogeneous suspension. Cells were surface stained with anti-mouse anti-CD45, anti-CD11b, anti-CD11c, and anti-F4/80 fluorescence-labeled monoclonal antibodies and their respective isotype controls (all from BioLegend, San Diego, CA) for quantitation of interstitial (CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁻ F4/80⁺) and alveolar (CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁺ F4/80⁺) macrophages and dendritic cells (CD45⁺ CD11b⁺ CD11c⁻ F4/80⁻); with anti-CD45, anti-CD3, and anti-Gr-1 to quantitate Gr-1⁺ cells (CD45⁺ CD3⁻ Gr-1⁺); and with anti-CD45, anti-CD4, and anti-CD8 to quantitate CD4⁺ (CD45⁺ CD4⁺ CD8⁻) and CD8⁺ (CD45⁺ CD4⁻ CD8⁺) T-cell populations. Red blood cells were removed with FACS lysing solution (BD Biosciences), and the remaining total extracted cells were counted using a hemacytometer. Cell surface marker analysis was conducted on a FACSCalibur flow cytometer (BD Biosciences) equipped with CellQuest software. Data were acquired for 30,000 events by gating on CD45⁺ cells. Results for each immune cell population were calculated as both the percentage of CD45⁺ cells and the absolute number of cells extracted from the lungs of a single mouse.

Production of cytokines. To assay the production of cytokines, lungs were harvested from CD4C/HIV^{MutA} Tg mice and non-Tg littermates 7 or 14 days after intranasal infection with 1.25×10^4 CFU of *C. neoformans* H99 or 1.25×10^5 CFU of *C. gattii* R265. Uninfected control mice received intranasal PBS. Lungs were mechanically disrupted in a mortar containing 2 ml of PBS. Lung homogenates were centrifuged, and supernatants were stored at -80°C. Cytokines in supernatants were assayed using a BD Flex cytometric bead array set (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol on a FACSCalibur flow cytometer equipped with BD CellQuest software. Data analysis was performed using BD FCAP array software 3.0.

Statistical analysis. Kaplan-Meier modeling and a log rank (Mantel-Cox) test were used to compare survival of *C. neoformans* var. *grubii*- and *C. gattii*-infected Tg and non-Tg mice. Organ burdens of *Cryptococcus* were compared using the Kruskal-Wallis test, and significant interactions were further analyzed by use of the Mann-Whitney test. *Cryptococcus* cell body diameters and capsule thicknesses, lung immune cell populations, and cytokine production were analyzed with SPSS, version 19, software (SPSS, Chicago, IL), using analysis of variance. Differences were considered significant if the *P* value was <0.05.

RESULTS

Enhanced susceptibility to cryptococcosis in Tg mice. Tg and non-Tg mice were infected intranasally with three graded inocula of *C. neoformans* (strain H99 or C23) or *C. gattii* (strain R265 or R272) and then assessed for survival and organ burdens. Survival of both Tg and non-Tg mice was inversely correlated with the inoculum size of *C. neoformans* and *C. gattii*, with the single exception of Tg mice infected with strain R265 (Fig. 1A). Although *C. neoformans* strain C23 was less virulent than *C. neoformans*

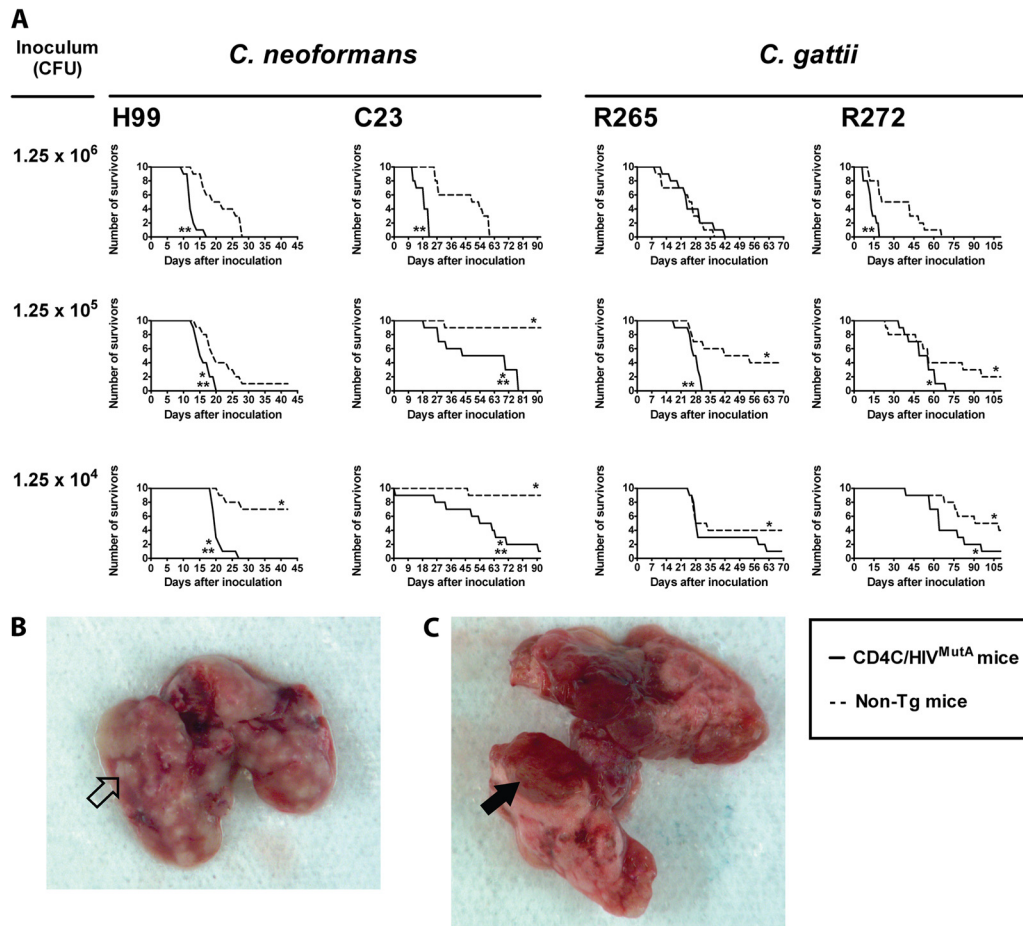


FIG 1 (A) Survival of Tg and non-Tg mice infected with *Cryptococcus neoformans* (strain H99 or C23) or *Cryptococcus gattii* (strain R265 or R272). Ten mice were infected intranasally at each of the indicated inocula. Significant differences are indicated as follows: *, $P < 0.01$ versus mice infected with the same strain at an inoculum of 1.25×10^6 CFU; and **, $P < 0.01$ for Tg versus non-Tg mice infected with identical inocula of the same strain. (B and C) Lungs harvested at necropsy from Tg and non-Tg mice infected with *C. neoformans* H99 or *C. gattii* R265 all showed multiple hemorrhagic (filled arrowhead) and abscess-like (open arrowhead) surface lesions. Representative examples are shown for a non-Tg mouse infected with *C. neoformans* H99 (B) and a Tg mouse infected with *C. gattii* R265 (C).

strain H99 in Tg and non-Tg mice at all three inocula ($P < 0.03$), Tg mice infected with these two *C. neoformans* strains consistently displayed reduced survival compared to non-Tg mice infected at the same three inocula. The enhanced susceptibility to cryptococcosis in the Tg mice was especially prominent in animals infected with the low inoculum of 1.25×10^4 CFU of *C. neoformans* H99, none of which survived, in comparison to the 70% survival of the non-Tg animals (Fig. 1A). Likewise, the mortality of Tg mice infected with *C. neoformans* C23 at this inoculum was 90%, compared to 10% for the non-Tg mice (Fig. 1A). In contrast to the *C. neoformans* infections, shortened survival of Tg mice infected with *C. gattii* strain R265 or R272 was restricted to a single higher inoculum (1.25×10^5 or 1.25×10^6 , respectively) (Fig. 1A). Lungs harvested at necropsy from Tg and non-Tg mice infected with *C. neoformans* H99 or *C. gattii* R265 were macroscopically indistinguishable. All showed multiple hemorrhagic and abscess-like surface lesions (Fig. 1B and C). Taken together, the results of these survival studies clearly demonstrated that HIV-1 transgene expression markedly and consistently enhanced susceptibility to *C. neoformans*, independent of the inoculum, while this effect was discernible only at a single inoculum with *C. gattii*.

Organ burdens of euthanized mice pre-mortem, determined as CFU/g (Tables 1 and 2), demonstrated a close correlation with survival of Tg and non-Tg mice infected with *C. neoformans* or *C. gattii*. In non-Tg mice, organ burdens in the liver and spleen increased significantly with the inoculum size of the two *C. neoformans* strains ($P \leq 0.001$), but not the two *C. gattii* strains ($P > 0.05$), but in Tg mice, inoculum size had no significant effect on organ burdens of either *C. neoformans* or *C. gattii* ($P > 0.05$). The two *C. neoformans* strains produced comparable burdens in the liver and spleen within the Tg and non-Tg groups of mice ($P > 0.05$), but both sets of burdens were greater than those produced by the two *C. gattii* strains ($P < 0.03$), which did not differ significantly from each other ($P > 0.05$). Interestingly, the reduced survival of Tg mice infected with *C. neoformans* compared to infected non-Tg animals was correlated with strikingly enhanced systemic dissemination to the liver and spleen of strains H99 and C23 at the two lowest inocula (1.25×10^4 and 1.25×10^5 CFU) ($P < 0.03$) (Table 1). In contrast, burdens of *C. gattii* strains R265 and R272 in these organs were comparable at all three inocula in Tg and non-Tg mice ($P > 0.05$) (Table 2), demonstrating that HIV-1 transgene expression selectively augments systemic dis-

TABLE 1 Viable CFU in organs of CD4C/HIV^{Muta} Tg mice inoculated intranasally with *Cryptococcus neoformans*

Strain and variable	Tg mice		Control non-Tg mice			
	Value ^a					
<i>C. neoformans</i> H99	1.25 × 10 ⁶	1.25 × 10 ⁵	1.25 × 10 ⁴	1.25 × 10 ⁶	1.25 × 10 ⁵	1.25 × 10 ⁴
Inoculum (CFU)	10	10	10	10	10	10
No. of mice inoculated	59 (49-63)	54 (50-57)	60 (50-64)	49 (42-63)	53 (45-67)	61 (50-64)
Mean (range) age at inoculation (days)	72 (61-80) ^b	70 (64-75) ^b	80 (70-84) ^b	70 (58-80) ^b	76 (65-93) ^c	96 (73-106) ^c
Mean (range) age at assessment (days)	Variables for organs culture positive for <i>C. neoformans</i>					
Brain						
No. of mice	7	9	9	10	8	5
<i>C. neoformans</i> count (CFU/g)	8.8 × 10 ⁷	2.5 × 10 ⁷	7.1 × 10 ⁷	6.0 × 10 ⁷	5.3 × 10 ⁷	6.2 × 10 ⁷
Range of counts	7.4 × 10 ⁵ -3.8 × 10 ⁸	1.4 × 10 ⁴ -1.0 × 10 ⁸	2.7 × 10 ⁴ -2.8 × 10 ⁸	3.3 × 10 ⁵ -1.6 × 10 ⁸	2.7 × 10 ⁴ -1.3 × 10 ⁸	7.9 × 10 ⁴ -2.0 × 10 ⁸
Lungs						
No. of mice	9	10	9	10	9	6
<i>C. neoformans</i> count (CFU/g)	2.0 × 10 ⁹	1.3 × 10 ⁹	2.5 × 10 ⁹	1.2 × 10 ⁹	1.0 × 10 ⁹	3.8 × 10 ⁸
Range of counts	2.7 × 10 ⁸ -8.7 × 10 ⁹	1.8 × 10 ⁷ -5.0 × 10 ⁹	9.6 × 10 ⁷ -4.7 × 10 ⁹	8.6 × 10 ⁷ -5.4 × 10 ⁹	6.2 × 10 ⁶ -6.3 × 10 ⁹	6.9 × 10 ⁵ -6.9 × 10 ⁸
Liver						
No. of mice	9	10	9	10	9	4
<i>C. neoformans</i> count (CFU/g)	4.6 × 10 ⁵	1.3 × 10 ⁶	3.5 × 10 ⁵	2.9 × 10 ⁵	8.8 × 10 ⁴	7.3 × 10 ⁴
Range of counts	2.5 × 10 ⁴ -2.5 × 10 ⁶	4.2 × 10 ⁴ -7.6 × 10 ⁶	1.3 × 10 ⁵ -6.5 × 10 ⁵	2.9 × 10 ⁴ -8.4 × 10 ⁵	1.1 × 10 ⁴ -3.2 × 10 ⁵	1.9 × 10 ⁴ -2.1 × 10 ⁵
Spleen						
No. of mice	8	9	9	10	8	3
<i>C. neoformans</i> count (CFU/g)	3.6 × 10 ⁶	1.5 × 10 ⁶	1.5 × 10 ⁶	4.0 × 10 ⁵	2.2 × 10 ⁵	6.0 × 10 ⁴
Range of counts	1.1 × 10 ⁵ -2.2 × 10 ⁷	2.3 × 10 ⁵ -2.8 × 10 ⁶	3.6 × 10 ⁵ -4.0 × 10 ⁶	5.4 × 10 ⁴ -1.1 × 10 ⁶	1.8 × 10 ⁴ -6.5 × 10 ⁵	9.1 × 10 ³ -1.2 × 10 ⁵
<i>C. neoformans</i> C23						
Inoculum (CFU)	1.25 × 10 ⁶	1.25 × 10 ⁵	1.25 × 10 ⁴	1.25 × 10 ⁶	1.25 × 10 ⁵	1.25 × 10 ⁴
No. of inoculated mice	10	10	10	10	10	10
Mean (range) age at inoculation (days)	53 (50-56)	53 (46-60)	46 (43-52)	45 (43-57)	49 (49-50)	52 (50-54)
Mean (range) age at assessment (days)	71 (62-77) ^b	105 (65-134) ^b	100 (53-135) ^d	90 (69-113) ^b	135 (81-142) ^d	140 (99-146) ^d
Variables for organs culture positive for <i>C. neoformans</i>						
Brain						
No. of mice	8	7	6	6	0	0
<i>C. neoformans</i> count (CFU/g)	2.2 × 10 ⁷	4.4 × 10 ⁶	8.1 × 10 ⁶	1.2 × 10 ⁷	NA	NA
Range of counts	3.6 × 10 ⁴ -7.1 × 10 ⁷	5.9 × 10 ³ -2.0 × 10 ⁷	9.5 × 10 ³ -1.4 × 10 ⁷	8.2 × 10 ⁵ -4.3 × 10 ⁷	NA	NA
Lungs						
No. of mice	10	7	4	8	1	0
<i>C. neoformans</i> count (CFU/g)	4.2 × 10 ⁸	1.3 × 10 ⁸	2.2 × 10 ⁸	5.7 × 10 ⁸	4.4 × 10 ⁶	NA
Range of counts	1.2 × 10 ⁸ -9.4 × 10 ⁸	7.7 × 10 ⁵ -3.2 × 10 ⁸	2.1 × 10 ⁶ -3.9 × 10 ⁸	1.7 × 10 ⁷ -1.5 × 10 ⁹	NA	NA
Liver						
No. of mice	10	7	4	7	1	0
<i>C. neoformans</i> count (CFU/g)	6.1 × 10 ⁵	6.0 × 10 ⁵	2.2 × 10 ⁶	3.4 × 10 ⁶	4.4 × 10 ³	NA
Range of counts	3.9 × 10 ⁴ -2.5 × 10 ⁶	1.5 × 10 ³ -2.1 × 10 ⁶	1.4 × 10 ⁴ -4.3 × 10 ⁶	9.6 × 10 ³ -8.6 × 10 ⁶	NA	NA
Spleen						
No. of mice	10	5	4	5	0	0
<i>C. neoformans</i> count (CFU/g)	2.8 × 10 ⁶	2.8 × 10 ⁶	3.1 × 10 ⁷	4.1 × 10 ⁶	NA	NA
Range of counts	1.8 × 10 ⁵ -1.7 × 10 ⁷	2.0 × 10 ⁵ -7.7 × 10 ⁶	1.0 × 10 ⁵ -7.4 × 10 ⁷	1.6 × 10 ⁵ -8.5 × 10 ⁶	NA	NA

^a Mice studied included Tg and control non-Tg offspring derived from the founder mouse F21388. NA, not applicable.

^b Assessment was done on the day of euthanization because of severe illness.

^c Assessment was done on the day of euthanization because of severe illness; survivors were euthanized 42 days after inoculation with *C. neoformans*.

^d Assessment was done on the day of euthanization because of severe illness; survivors were euthanized 92 days after inoculation with *C. neoformans*.

TABLE 2 Viable CFU in organs of CD4C/HIV^{MutA} Tg mice inoculated intranasally with *Cryptococcus gattii*

Strain and variable	Value ^e	
	Tg mice	Control non-Tg mice
<i>C. gattii</i> R265		
Inoculum (CFU)	1.25 × 10 ⁶	1.25 × 10 ⁶
No. of inoculated mice	10	10
Mean (range) age at inoculation (days)	57 (55–62)	56 (52–62)
Mean (range) age at assessment (days)	83 (70–100) ^b	79 (61–92) ^b
Variables for organs culture positive for <i>C. gattii</i>		
Brain		
No. of mice	6	4
<i>C. gattii</i> count (CFU/g)	1.4 × 10 ⁴	8.3 × 10 ⁴
Range of counts	1.4 × 10 ⁴ –2.2 × 10 ⁵	7.4 × 10 ⁴ –2.9 × 10 ⁵
Lungs		
No. of mice	10	9
<i>C. gattii</i> count (CFU/g)	1.5 × 10 ⁸	1.3 × 10 ⁸
Range of counts	4.6 × 10 ⁷ –3.8 × 10 ⁸	5.9 × 10 ⁷ –3.2 × 10 ⁸
Liver		
No. of mice	4	3
<i>C. gattii</i> count (CFU/g)	1.3 × 10 ⁶	3.3 × 10 ⁴
Range of counts	1.8 × 10 ³ –3.9 × 10 ⁶	1.4 × 10 ³ –6.8 × 10 ⁴
Spleen		
No. of mice	1	0
<i>C. gattii</i> count (CFU/g)	1.8 × 10 ⁶	3.1 × 10 ⁵
Range of counts	NA	NA
<i>C. gattii</i> R272		
Inoculum (CFU)	1.25 × 10 ⁶	1.25 × 10 ⁶
No. of inoculated mice	10	10
Mean (range) age at inoculation (days)	53 (47–59)	56 (46–59)
Mean (range) age at assessment (days)	66 (58–75) ^b	89 (62–125) ^b
Variables for organs culture positive for <i>C. gattii</i>		
Brain		
No. of mice	1	5
<i>C. gattii</i> count (CFU/g)	5.9 × 10 ³	9.6 × 10 ⁴
Range of counts	NA	1.8 × 10 ⁴ –2.4 × 10 ⁵
Lungs		
No. of mice	8	8
<i>C. gattii</i> count (CFU/g)	7.2 × 10 ⁷	1.0 × 10 ⁸
Range of counts	5.0 × 10 ⁷ –1.1 × 10 ⁸	2.0 × 10 ⁸ –3.5 × 10 ⁸
Liver		
No. of mice	1	2
<i>C. gattii</i> count (CFU/g)	1.9 × 10 ⁴	2.7 × 10 ⁴
Range of counts	NA	2.1 × 10 ⁴ –3.2 × 10 ⁴
Spleen		
No. of mice	0	0
<i>C. gattii</i> count (CFU/g)	NA	NA
Range of counts	NA	NA

^a Mice studied included Tg and control non-Tg offspring derived from the founder mouse F21388. NA, not applicable.

^b Assessment was done on the day of euthanization because of severe illness.

^c Assessment was done on the day of euthanization because of severe illness; survivors were euthanized 69 days after inoculation with *C. gattii*.

^d Assessment was done on the day of euthanization because of severe illness; survivors were euthanized 110 days after inoculation with *C. gattii*.

TABLE 3 Viable CFU in organs of CD4C/HIV^{Muta} Tg mice inoculated intranasally with *Cryptococcus* spp.

Strain (inoculum) and variable	Value ^a			
	Tg mice		Control non-Tg mice	
<i>Cryptococcus neoformans</i> H99 (1.25 × 10 ⁴ CFU)				
Days after inoculation	7	14	7	14
No. of inoculated mice	6	6	6	6
Variables for organs culture positive for <i>C. neoformans</i>				
Brain				
No. of mice	0	4	0	2
<i>C. neoformans</i> count (CFU/g)	NA	2.5 × 10 ⁶	NA	6.9 × 10 ⁶
Range of counts	NA	4.4 × 10 ⁴ -8.5 × 10 ⁶	NA	3.8 × 10 ⁵ -1.4 × 10 ⁷
Lungs				
No. of mice	6	6	6	6
<i>C. neoformans</i> count (CFU/g)	1.1 × 10 ⁸	6.1 × 10 ⁸	6.7 × 10 ⁷	2.0 × 10 ⁸
Range of counts	3.3 × 10 ⁷ -3.9 × 10 ⁸	4.6 × 10 ⁷ -1.1 × 10 ⁹	3.6 × 10 ⁷ -1.0 × 10 ⁸	1.0 × 10 ⁸ -3.1 × 10 ⁸
Liver				
No. of mice	0	4	2	1
<i>C. neoformans</i> count (CFU/g)	NA	4.1 × 10 ⁴	9.6 × 10 ³	6.5 × 10 ³
Range of counts	NA	2.3 × 10 ⁴ -5.8 × 10 ⁴	7.9 × 10 ³ -1.1 × 10 ⁴	NA
Spleen				
No. of mice	0	4	0	1
<i>C. neoformans</i> count (CFU/g)	NA	2.7 × 10 ⁵	NA	1.8 × 10 ⁴
Range of counts	NA	1.6 × 10 ⁵ -4.2 × 10 ⁵	NA	NA
<i>Cryptococcus gattii</i> R265 (1.25 × 10 ⁵ CFU)				
Days after inoculation	7	14	7	14
No. of inoculated mice	6	6	6	6
Variables for organs culture positive for <i>C. gattii</i>				
Brain				
No. of mice	0	1	4	0
<i>C. gattii</i> count (CFU/g)	NA	3.5 × 10 ⁵	2.4 × 10 ⁴	NA
Range of counts	NA	NA	1.3 × 10 ⁴ -5.9 × 10 ⁴	NA
Lungs				
No. of mice	6	6	6	6
<i>C. gattii</i> count (CFU/g)	1.7 × 10 ⁸	1.9 × 10 ⁸	1.6 × 10 ⁸	2.5 × 10 ⁸
Range of counts	3.9 × 10 ⁷ -2.4 × 10 ⁸	1.0 × 10 ⁸ -3.6 × 10 ⁸	4.0 × 10 ⁷ -2.6 × 10 ⁸	1.8 × 10 ⁸ -3.3 × 10 ⁸
Liver				
No. of mice	0	2	1	1
<i>C. gattii</i> count (CFU/g)	NA	6.0 × 10 ³	3.7 × 10 ³	5.7 × 10 ⁴
Range of counts	NA	4.2 × 10 ³ -7.8 × 10 ³	NA	NA
Spleen				
No. of mice	0	0	0	0
<i>C. gattii</i> count (CFU/g)	NA	NA	NA	NA
Range of counts	NA	NA	NA	NA

^a Mice studied included Tg and control non-Tg offspring derived from the founder mouse F21388. NA, not applicable.

semination to the liver and spleen for *C. neoformans* but not *C. gattii*. However, enhanced burdens in brains of Tg compared to non-Tg mice were observed at the two lowest inocula with *C. neoformans* strain C23 only ($P \leq 0.002$), not strain H99 ($P > 0.05$) or the two *C. gattii* strains ($P > 0.05$) (Tables 1 and 2), showing that HIV-1 transgene-mediated augmentation of *C. neoformans* dissemination to the brain may be strain dependent.

Enhanced cryptococcal burdens and more frequent dissemination to the liver and spleen were also found in Tg compared to non-Tg mice euthanized at the fixed time of 14 days after infection with the lowest inoculum (1.25 × 10⁴ CFU) of *C. neoformans* H99 ($P < 0.05$) (Table 3). Seven days after infection, however, no systemic dissemination had yet occurred, and pulmonary burdens were comparatively lower than those at day 14 ($P < 0.02$) and were not significantly different ($P > 0.05$) in Tg and non-Tg mice (Table 3). In contrast to the case with *C. neoformans* H99, however,

lung burdens were comparable at days 7 and 14 ($P > 0.05$), the frequency of systemic dissemination remained low, and cryptococcal burdens in the liver and spleen were comparable in Tg and non-Tg mice 14 days after infection with an intermediate inoculum (1.25 × 10⁵ CFU) of *C. gattii* strain R265 ($P > 0.05$) (Table 3).

Defective inflammatory cell response to *Cryptococcus* in Tg mice. Histopathologic examination of lungs was conducted on days 7 and 14 after infection and pre-mortem to identify the nature, location, and extent of the inflammatory cell response to *C. neoformans* strain H99 and *C. gattii* strain R265 (Fig. 2; see Fig. S1 to S3 in the supplemental material). The pulmonary inflammatory responses to *C. neoformans* were strikingly and consistently different in Tg and non-Tg mice. Seven days after infection of the Tg mice, numerous *C. neoformans* cells were located in the bronchioles and formed cysts or were individually dispersed throughout the lung parenchyma, with a minimal scattered mononuclear

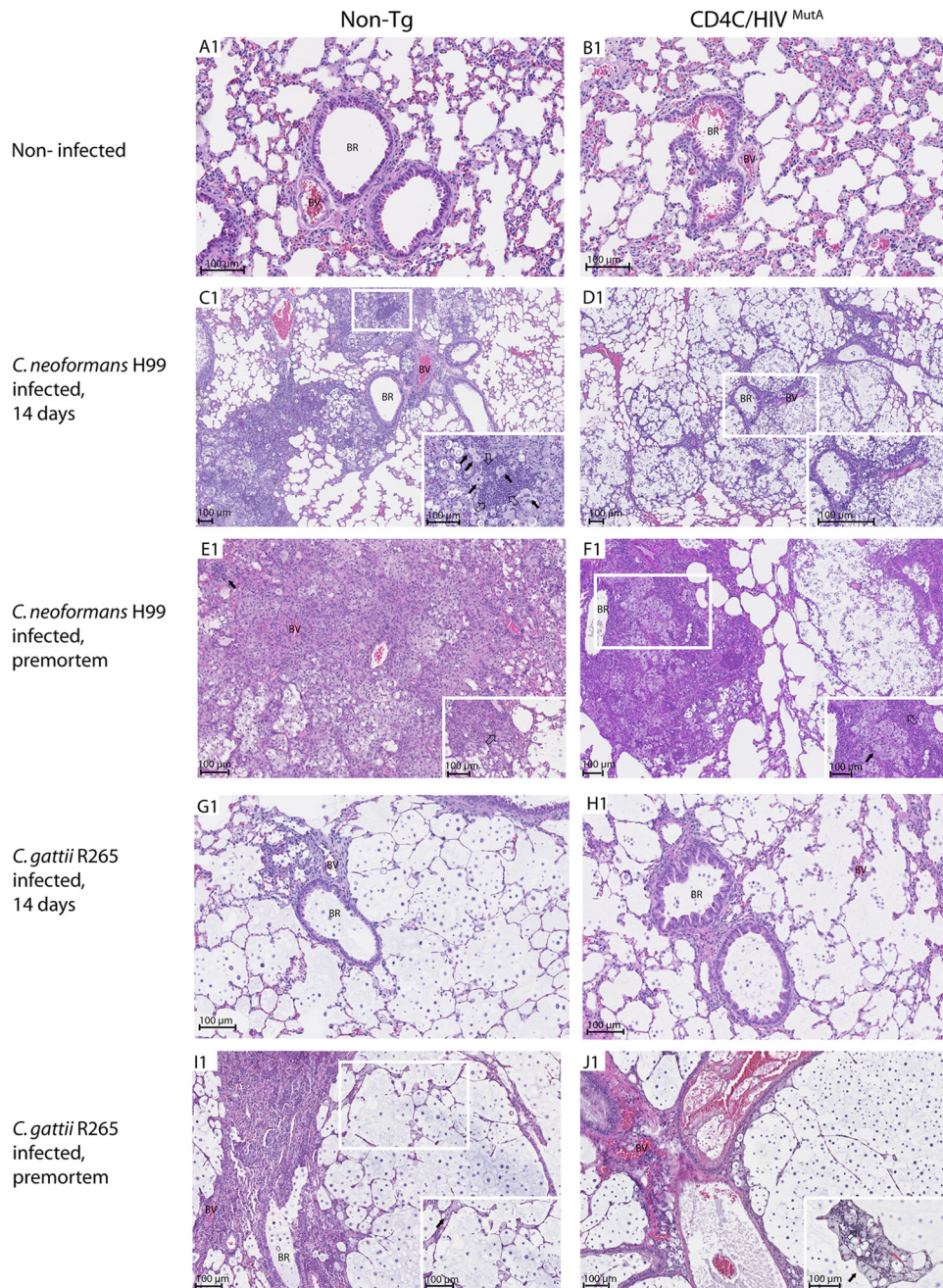


FIG 2 Histopathology of lungs from Tg and non-Tg mice, either uninfected or assessed on day 14 or pre-mortem after intranasal infection with 1.25×10^4 CFU of *Cryptococcus neoformans* H99 or 1.25×10^5 CFU of *Cryptococcus gattii* R265. Tissues were stained with hematoxylin phloxine saffron (HPS). Fourteen days after infection of non-Tg mice (C1), *C. neoformans* was present in great numbers and was almost entirely embedded within extensive mixed inflammatory infiltrates comprised of macrophages (filled arrowheads) and polymorphonuclear leukocytes (open arrowheads) (C1, enlarged inset) and only rarely observed in the remaining lung parenchyma, in marked contrast to the case with Tg mice, which displayed predominantly innumerable and widely scattered *C. neoformans* cells, with a minimal inflammatory cell response (D1) and only rarely enclosed within discrete bronchovascular infiltrates (enlarged inset). Pre-mortem non-Tg mice displayed necrotizing granulomas containing epithelioid cells (filled arrowhead) and Langhans-type giant cells (open arrowhead) (E1), in contrast to Tg mice, which showed no granulomas but numerous macrophages (filled arrowhead) and polymorphonuclear leukocytes (open arrowhead) and wide areas of lung parenchyma containing numerous *C. neoformans* cells but no inflammatory response (F1). *C. gattii* was widely dispersed throughout the lung tissue and induced only a modest and localized inflammatory response comprised of macrophages (filled arrowheads) and polymorphonuclear leukocytes (open arrowhead) in Tg and non-Tg mice (G1 to J1). BR, bronchiole; BV, blood vessel. Images are representative of 2 (A1 and B1) or 6 (C1 to J1) mice per group, with consistent results.

cell infiltrate (see Fig. S2L1 and S3L2). In contrast, the non-Tg mice displayed dense bronchovascular infiltrates containing mononuclear cells and polymorphonuclear leukocytes (PMNs) completely enclosing *C. neoformans* (see Fig. S2K1). Fourteen

days after infection of the Tg mice, much larger numbers of *C. neoformans* cells were widely scattered in the lung tissue, with a minimal inflammatory cell response, and were rarely observed within discrete bronchovascular infiltrates containing mostly

PMNs and a few mononuclear cells (Fig. 2D1; see Fig. S1D2). In striking contrast, in non-Tg mice, *C. neoformans* cells were almost entirely embedded within far more extensive mixed inflammatory infiltrates comprised of PMNs and macrophages and were seldom observed in the remaining lung parenchyma, which was devoid of inflammatory cells (Fig. 2C1). Finally, premortem non-Tg mice again displayed a widespread inflammatory response, with the added appearance at this late time point of necrotizing granulomas containing epithelioid cells and Langhans-type giant cells (Fig. 2E1). This was in contrast to the Tg mice, which displayed more limited inflammatory foci containing abundant macrophages and PMNs but no granulomas, as well as broad areas of lung parenchyma containing numerous *C. neoformans* cells but no inflammatory response (Fig. 2F1).

In sharp contrast to the case for infection with *C. neoformans*, numerous *C. gattii* cells were widely dispersed throughout the lung tissue and induced only a sparse inflammatory response on days 7 and 14 after infection in both Tg and non-Tg mice (Fig. 2G1 and H1; see Fig. S1 to S3 in the supplemental material). A modest and circumscribed inflammatory response comprised of macrophages and PMNs appeared only in premortem animals and was independent of HIV-1 transgene expression (Fig. 2I1 and J1).

Interestingly, macrophages in lung tissue sections from Tg and non-Tg mice infected with *C. neoformans* or *C. gattii* often displayed the distinctive appearance of “huevo” cells filled with vesicles containing capsular polysaccharide (31, 32). These cells were observed beginning on day 14 after infection and became more abundant in mice assessed premortem.

Histopathologic examination of the brains of Tg and non-Tg mice on day 7 after infection with *C. neoformans* showed that the brains were entirely normal, in accordance with the absence of systemic dissemination to this organ at this early time point (Table 3). On day 14 after infection, however, histopathology revealed *C. neoformans* in the brain parenchyma of a single non-Tg mouse which displayed culture evidence of dissemination to this organ, but not in the other animals, which were either culture positive or negative (Table 3). Taken together with the organ burdens, these results indicated that the onset of dissemination to the brain for *C. neoformans* was detectable more than 7 days after infection in both Tg and non-Tg mice and did not occur earlier in the Tg mice, despite their enhanced frequency of systemic dissemination (Tables 1 and 2). Examination of the brains of Tg and non-Tg mice 7 and 14 days after infection with *C. gattii* did not show histopathologic evidence of the fungus, in accordance with lower burdens of *C. gattii* than of *C. neoformans* in this organ (Table 3).

Cell body diameters and capsule thicknesses of 100 randomly selected *C. neoformans* or *C. gattii* cells were determined in lung tissue sections from Tg and non-Tg mice 7 or 14 days after infection. For both *C. neoformans* and *C. gattii*, cell body diameters and capsule thicknesses increased significantly from day 7 to day 14 after infection of non-Tg mice ($P < 0.001$) but not Tg mice ($P > 0.05$), and both measurements were greater in non-Tg than in Tg mice on day 14 after infection with these two species ($P < 0.001$) (Table 4). However, cell body diameters and capsule thicknesses of *C. neoformans* H99 were markedly greater than those of *C. gattii* R265 both 7 and 14 days after infection of both Tg and non-Tg mice ($P < 0.001$), showing that the dimensions of these two species consistently differ *in vivo*, irrespective of time after infection or HIV-1 transgene expression (Table 4). Interestingly, using a cell body diameter threshold of 15 μm , 22 to 53% of *C. neoformans*

TABLE 4 Cell body diameters and capsule thicknesses of *C. neoformans* H99 and *C. gattii* R265 in mucicarmine-stained lung tissue sections 7 or 14 days after infection of CD4C/HIV^{MutA} Tg or non-Tg mice

Measurement and strain	Value after infection ^a			
	Tg mice		Non-Tg mice	
	7 days	14 days	7 days	14 days
Cell body diameter (μm)				
<i>C. neoformans</i> H99	11.8 \pm 4.2 ^b	11.4 \pm 4.5 ^b	12.4 \pm 3.6 ^b	15.4 \pm 3.5 ^{b,c,d}
<i>C. gattii</i> R265	10.3 \pm 2.8	9.8 \pm 2.7	9.5 \pm 2.9	12.0 \pm 2.8 ^{c,d}
Capsule thickness (μm)				
<i>C. neoformans</i> H99	5.0 \pm 1.9 ^b	5.6 \pm 2.5 ^b	6.3 \pm 1.8 ^b	8.2 \pm 2.0 ^{b,c,d}
<i>C. gattii</i> R265	4.9 \pm 1.4	4.7 \pm 2.3	3.5 \pm 1.3	6.2 \pm 2.0 ^{c,d}

^a Data are means \pm standard deviations for 100 randomly selected cells.

^b $P < 0.001$ compared to *C. gattii* R265.

^c $P < 0.001$ compared to non-Tg mice at day 7.

^d $P < 0.001$ compared to Tg mice at day 14.

H99 cells comprised giant (titan) cells (33), but these cells were seen less frequently (3 to 12% of cells) in tissue sections from mice infected with *C. gattii* 265.

Altered lung immune cell populations in response to *Cryptococcus* in Tg mice. To quantitatively assess the impact of HIV-1 transgene expression on lung immune cell populations, multiparametric flow cytometry analysis was conducted on CD4C/HIV^{MutA} Tg mice and non-Tg littermates 7 and 14 days after infection or no infection with *C. neoformans* H99 or *C. gattii* R265. On both days, transgene expression independently caused striking reductions in the percentages of CD4⁺ and CD8⁺ T cells ($P < 0.001$) (Fig. 3). Furthermore, on day 14, total numbers of extracted pulmonary cells were significantly lower in Tg mice than in non-Tg mice ($P = 0.002$), correlating with the defective inflammatory cell response to *Cryptococcus* observed on histopathology. Independent of cryptococcal infection, percentages of alveolar macrophages were significantly increased ($P < 0.05$) in Tg compared to non-Tg mice on days 7 and 14 (Fig. 3). Similar findings were observed with Gr-1⁺ cells, but they reached statistical significance only on day 7 (Fig. 3). In addition, from day 7 to day 14, in both Tg and non-Tg mice, the percentages of dendritic cells, alveolar macrophages, and Gr-1⁺ cells were significantly increased in animals infected with either *C. neoformans* or *C. gattii* ($P \leq 0.02$), while a similar increase in interstitial macrophages during the same interval was restricted to *C. gattii* ($P < 0.001$). We cannot formally exclude the possibility that in addition to PMNs, plasmacytoid dendritic cells and inflammatory monocytes, expressing Ly6C but not CD3, may have been recognized by the anti-Gr-1 antibody. Finally, absolute numbers of CD4⁺ and CD8⁺ cells, but not the other cell populations, were significantly diminished ($P < 0.05$) in the Tg compared to non-Tg mice on days 7 and 14 after infection or no infection with *C. neoformans* or *C. gattii* (data not shown).

Altered production of pulmonary cytokines in response to *Cryptococcus* in Tg mice. To determine if the reduced pulmonary inflammatory response to *Cryptococcus* observed in the Tg mice was associated with defective production of cytokines, Tg and non-Tg mice were assessed 7 or 14 days after infection or no infection with *C. neoformans* H99 or *C. gattii* R265. In comparison to the levels in non-Tg mice, HIV-1 transgene expres-

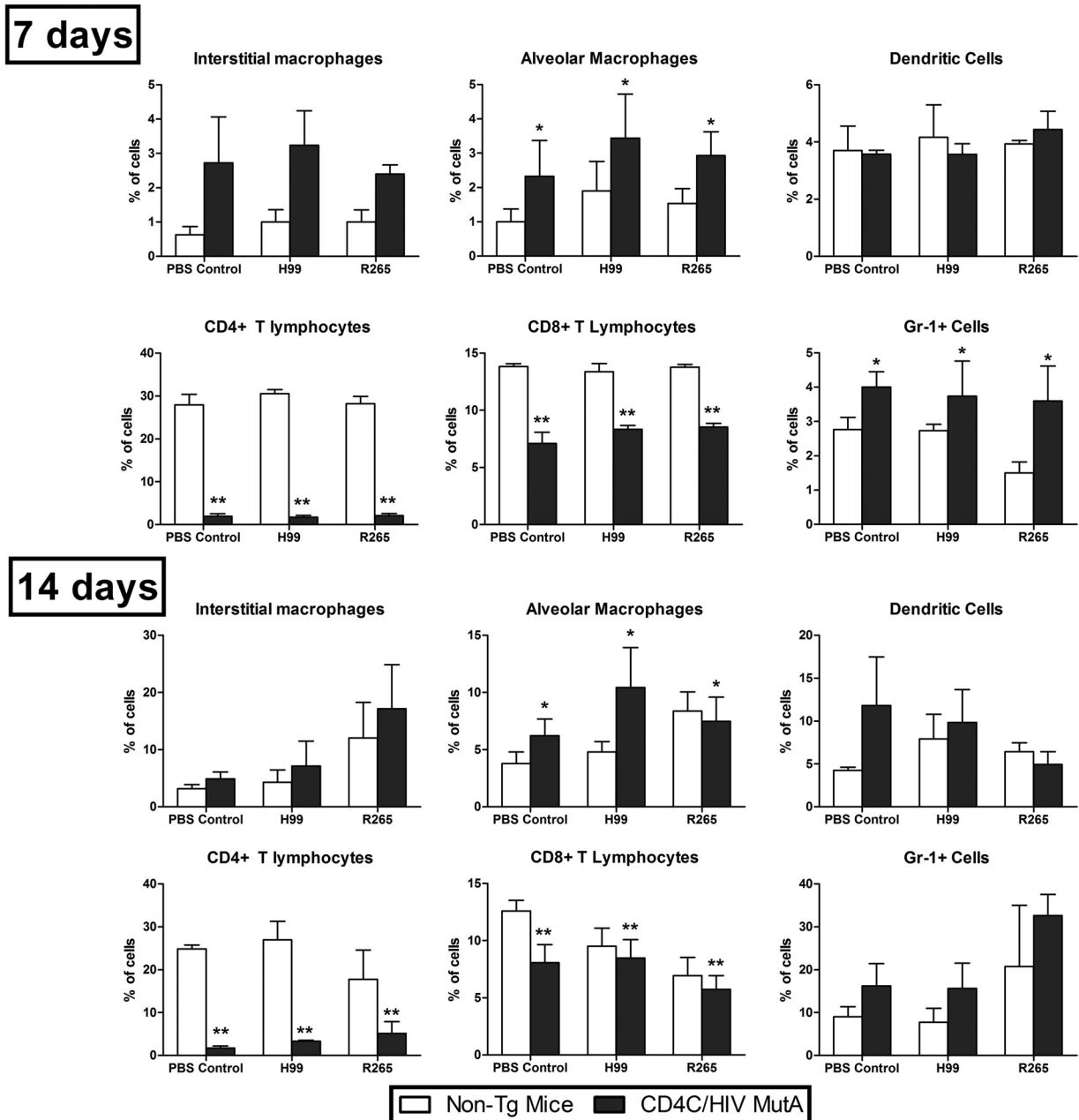
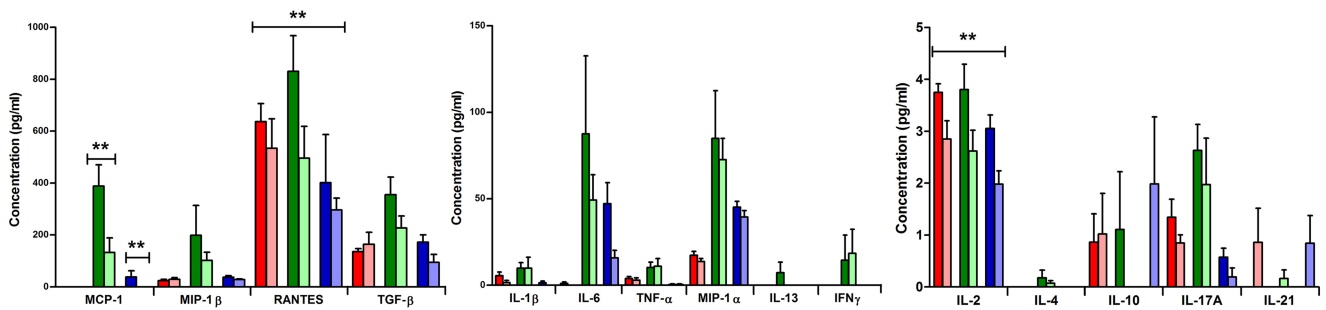


FIG 3 Flow cytometry analysis of lung immune cell populations in CD4C/HIV^{MutA} Tg and non-Tg mice 7 and 14 days after infection or no infection with *C. neoformans* H99 or *C. gattii* R265. Data are presented as percentages of CD45⁺ cells and are the means \pm standard errors of the means (SEM) of results from three or four independent experiments. Significant differences are indicated as follows: *, Tg > non-Tg mice ($P < 0.05$); and **, Tg < non-Tg mice ($P < 0.001$).

sion consistently reduced pulmonary production of the CC chemokines monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1; CCL2) and RANTES (CCL5) both 7 and 14 days after infection with *C. neoformans* or *C. gattii* ($P \leq 0.01$) (Fig. 4), suggesting that defective production of these chemotactic cytokines may contribute to the defective inflammatory response to *Cryptococcus* in Tg mice. In addition, in comparison to the case with *C. neoformans*, production of these two chemokines was significantly lower after infection with *C. gattii* ($P < 0.001$), which may partially explain the markedly reduced pulmonary inflammatory response to *C. gattii* in comparison to that to *C. neoformans*

in the non-Tg mice (Fig. 2). Indeed, a wide array of cytokines (interleukin-1 β [IL-1 β], tumor necrosis factor alpha [TNF- α], macrophage inflammatory protein 1 β [MIP-1 β], IL-13, transforming growth factor beta [TGF- β], and IL-4) increased significantly from day 7 to day 14 after infection with *C. neoformans* ($P < 0.001$) but not *C. gattii* ($P > 0.05$), and higher concentrations of TNF- α , MIP-1 α , MIP-1 β , IL-13, TGF- β , IL-2, and IL-4 were also found on day 14 after infection with *C. neoformans* compared to *C. gattii* ($P < 0.001$), independent of transgene expression. This differential production of cytokines after infection by the two species was especially prominent in

7 days



14 days

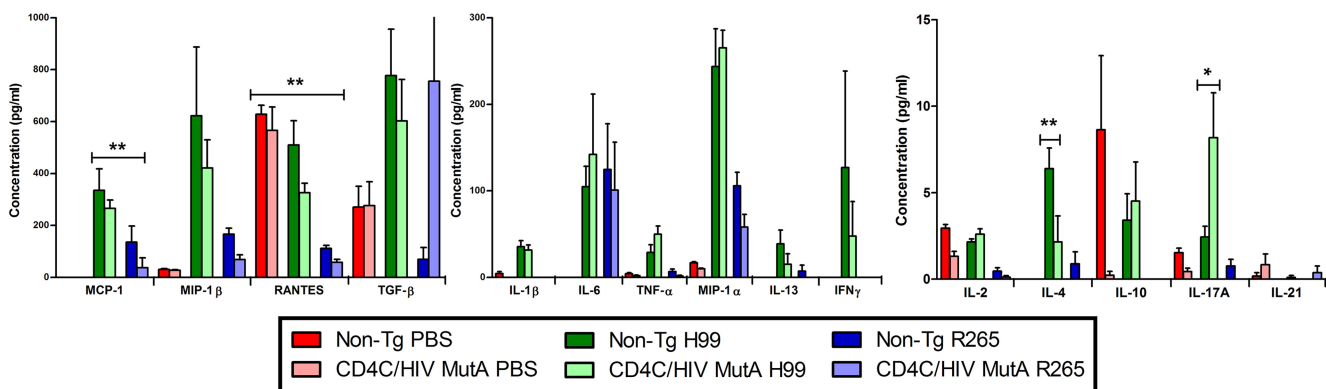


FIG 4 Cytokine production in lungs of CD4C/HIV^{MutA} Tg and non-Tg mice 7 and 14 days after infection or no infection with *C. neoformans* H99 or *C. gattii* R265. IL-12p70 (not shown) was undetectable in all mice. Data are the means \pm SEM of results from six mice. Significant differences are indicated as follows: *, Tg > non-Tg mice ($P < 0.05$); and **, Tg < non-Tg mice ($P < 0.05$).

the case of gamma interferon (IFN- γ), which was produced exclusively in response to infection with *C. neoformans*.

In sharp contrast, however, production of IL-6 and IL-10 increased significantly from day 7 to day 14 after infection with either of the two species ($P < 0.05$), suggesting that the lower pulmonary inflammatory response observed after infection with *C. gattii* than after infection with *C. neoformans* was not associated with a differing production of these two cytokines.

In addition to MCP-1 and RANTES, HIV-1 transgene expression resulted in decreased production of IL-2 on day 7 after infection ($P \leq 0.03$), a defect previously associated with enhanced susceptibility to cryptococcosis at this early time point of infection (34). However, in comparison to non-Tg controls on day 14, Tg mice infected with *C. neoformans* unexpectedly had reduced production of IL-4 ($P \leq 0.001$) and increased production of IL-17A ($P \leq 0.001$), both of which are associated with a protective rather than nonprotective anticryptococcal host response (35–37).

DISCUSSION

The model which we established recapitulates the hallmark histopathological features of human pulmonary *C. neoformans* (38, 39) and *C. gattii* (40) infections, including a minimal inflammatory cell infiltrate in transgenic mice infected with *C. neoformans* that reproduces the pathological findings in AIDS patients (38). The present results also clearly establish, for the first time in an animal

model, using controlled conditions with two strains each and three inocula of *C. neoformans* and *C. gattii*, that HIV-1 expression consistently augments susceptibility to *C. neoformans* but not that to *C. gattii*. This finding provides experimental evidence to support the results of epidemiological studies of cryptococcosis, which demonstrate that *C. neoformans* causes the overwhelming majority of infections in the setting of HIV infection, while *C. gattii* infections occur mostly in immunocompetent persons (12, 16). The lack of a significant transgene effect on mortality at the lowest inoculum of *C. gattii* (1.25×10^4 CFU), in contrast to an inoculum of 1.25×10^5 CFU, may have resulted from differing levels of the inflammatory response to *C. gattii* at these two inocula.

Assessments of organ burdens, lung histopathology, immune cell populations, and cytokine production were conducted at the fixed time points of 7 and 14 days after infection with 1.25×10^4 CFU of *C. neoformans* H99 or 1.25×10^5 CFU of *C. gattii* R265. These inocula were selected on the basis of the results of the survival study, which showed the greatest transgene effect on mortality at these inocula (Fig. 1), and therefore they were most likely to reveal differences in organ burdens at the fixed time points. Immune response parameters were assessed for the same inocula to allow a meaningful correlation with organ burden data.

In comparison to *C. neoformans*, infection of immunocompetent non-Tg C3H mice with *C. gattii* elicited a markedly reduced pulmonary inflammatory cell response, as reported previously for

C57BL/6 and A/JCr mice infected with identical inocula of the two species (17, 41). It is therefore unlikely that the less robust pulmonary inflammatory cell response to *C. gattii* than that to *C. neoformans* which we found in the non-Tg mice was caused by the higher inoculum.

The lower pulmonary inflammatory cell response to *C. gattii* was closely correlated with diminished production of several cytokines and chemokines, including MCP-1, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-13, TNF- α , IFN- γ , and TGF- β . Among these, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α , and IFN- γ all play a role in leukocyte recruitment to the lungs in response to *C. neoformans* infection (42–52). Accordingly, reduced production of these four cytokines may explain, at least in part, the strikingly sparse inflammatory cell response to *C. gattii* compared to that to *C. neoformans* in the non-Tg C3H mice. Interestingly, we found greater capsule thicknesses of *C. neoformans* than *C. gattii*, and it has been reported that increasing capsule thicknesses of *C. neoformans* augment the magnitudes of IL-1 β and TNF- α release by human PMNs (53). It would be relevant in future work to examine infection by *C. neoformans* 145A, which like *C. gattii* R265 induces a limited pulmonary inflammatory response (54), to determine if it behaves similarly to *C. gattii* in HIV-1-expressing Tg mice.

Despite these strikingly dissimilar host immune responses to *C. neoformans* and *C. gattii*, comparable lung burdens of both cryptococcal species were found on days 7 and 14 after infection and pre-mortem. This seemingly paradoxical finding could possibly be explained by the antiphagocytic properties of the cryptococcal capsule (55) and the reduced phagocytosis of cryptococcal giant (titan) cells (33, 56–58), which would allow *C. neoformans* to proliferate at a rate comparable to that of *C. gattii* despite the enhanced inflammatory cell response. However, in a recent report (41), *C. gattii* R265 produced higher lung burdens than those of *C. neoformans* H99 after infection of C57BL/6 and BALB/c mice, suggesting that the protective pulmonary immune responses to *Cryptococcus* of these two mouse strains may differ qualitatively or quantitatively from those of non-Tg C3H mice. Nevertheless, in the non-Tg C3H mice, dissemination of *C. neoformans* to the liver and spleen at the time of euthanasia largely exceeded that of *C. gattii*, demonstrating a greater capacity of *C. neoformans* for systemic dissemination in the immunocompetent host (41). The greater capsule thickness of *C. neoformans* than that of *C. gattii*, providing protection against reactive oxygen and nitrogen species within phagocytes (55), may have facilitated dissemination by a “Trojan horse” mechanism (59). Despite this enhanced dissemination, however, the survival of non-Tg C3H mice infected with the *C. neoformans* and *C. gattii* strains did not differ significantly, suggesting that the variable virulence of strains within each species outweighs any potentially consistent difference in virulence between these two cryptococcal species. In fact, previous studies comparing the virulence of *C. neoformans* H99 and *C. gattii* R265 in C57BL/6 and BALB/c mice produced inconsistent results (17, 41), indicating that the virulence of *C. neoformans* and *C. gattii* is likely comparable in many, if not most, strains of immunocompetent mice. This interpretation is supported by the balanced up-regulation in production of protective (IFN- γ) and nonprotective (IL-4 and IL-13) cytokines (36, 51, 52, 60, 61) in non-Tg C3H mice infected with *C. neoformans* compared to those infected with *C. gattii*. Taken together, the results of our survival studies demonstrate that HIV-1 transgene expression alters the course of cryptococcal infection to a far larger degree than any intrinsic differ-

ences in virulence, systemic dissemination, or host immune responses between *C. neoformans* and *C. gattii*.

Enhanced susceptibility to *C. neoformans* infection in the Tg mice was associated with a sharply reduced pulmonary inflammatory cell response and decreased production of the CC chemokines MCP-1 (CCL2) and RANTES (CCL5). The striking depletion of pulmonary CD4⁺ and CD8⁺ T cells in infected or uninfected Tg mice is congruent with the quantitative reductions of these cell populations in the oral mucosa, secondary lymphoid organs, and peripheral blood of these Tg mice (18, 23). The present results therefore suggest that the defective pulmonary CD4⁺ and CD8⁺ T-cell response to *C. neoformans* infection in Tg mice resulted from the primary depletion of these cell populations as a consequence of HIV-1 transgene expression, combined with a failure of their recruitment as a result of reduced production of the chemokines MCP-1 and RANTES, which attract activated T cells, monocytes, and dendritic cells. During pulmonary *C. neoformans* infection, upregulation of MCP-1 and MCP-3 (CCL7) production is required for CCR2-mediated recruitment of T cells, dendritic cells, and macrophages, formation of bronchovascular cell infiltrates, and development of protective Th1 immunity (42–48). Furthermore, SJL/J mice, which are resistant to *C. neoformans* infection, show enhanced MCP-1 mRNA expression compared to susceptible C57BL/6 mice (62). Potential cellular sources of MCP-1 in the lungs include epithelial cells, endothelial cells, fibroblasts, and macrophages (42). Of these specific cell populations, only macrophages express the HIV-1 transgene (19) and would thus be susceptible primarily to altered cytokine expression. In this regard, we have previously shown that F4/80⁺ macrophages recruited to the gastric submucosa and oral mucosa of HIV-1-expressing Tg mice in response to *Candida albicans* infection express the mannose receptor (CD206) almost uniformly, but MCP-1 only very infrequently (26), consistent with an alternatively activated (M2) phenotype known to be associated with susceptibility to cryptococcosis (36, 52). Furthermore, because it has been shown that experimental depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T cells independently abrogates the appearance of a protective inflammatory response to pulmonary *C. neoformans* infection and augments systemic dissemination (63–65), it is likely that the depletion of these T-cell populations in the Tg mice contributed to the reduced pulmonary inflammatory cell response to *C. neoformans* and the augmented systemic dissemination to the liver and spleen. Despite the defective pulmonary inflammatory cell response to *C. neoformans* in the Tg mice, pulmonary fungal burdens were remarkably comparable to those in non-Tg mice, suggesting that reduced survival of the Tg mice was caused primarily by enhanced systemic dissemination rather than increased proliferation of *C. neoformans* in the lungs (66). Surprisingly, augmented susceptibility of the Tg mice to *C. neoformans* infection was associated with diminished pulmonary production of IL-4 and increased production of IL-17A, which result in an alteration of the Th1-Th2-Th17 balance associated with a protective rather than a nonprotective host response to *C. neoformans* (35–37, 55). The augmented dissemination of *C. neoformans* to the liver and spleen in Tg mice, also previously observed in IL-23p19^{-/-} mice with impaired production of IL-17 (35), was therefore likely caused by perturbations other than a defective Th17 response.

Capsule thicknesses of *C. neoformans* and *C. gattii* in the lungs increased significantly during the course of infection of non-Tg mice (30) but not Tg mice. The mechanisms responsible for dif-

ferences in capsule thickness *in vivo* are unknown (30) but could potentially include variations in iron, CO₂, and nutrient concentrations in host tissues (30, 67). Interestingly, CD4C/HIV^{Nef} transgenic mice display increased circulating ferritin levels due to Nef-dependent release of ferritin from macrophages, and plasma ferritin levels are correlated with viral RNA in HIV-1-infected patients (68). *C. neoformans* can acquire iron bound to the major carrier transferrin by a reductive iron uptake pathway (69). Because growth of *C. neoformans* at high iron concentrations results in cells with thinner capsules (30) and lower expression of the CAP60 gene that is required for capsule production (70), increased availability of iron from the ferritin carrier may have contributed to the lack of capsule thickening during the course of cryptococcal infection in the Tg mice. However, despite the absence of capsule thickening during infection by both species, the capsule thickness of *C. neoformans* remained greater than that of *C. gattii* in the Tg mice and may have contributed to its enhanced systemic dissemination to the liver and spleen, which was also observed in the non-Tg mice.

The percentages of pulmonary dendritic cells, alveolar macrophages, and Gr-1⁺ cells increased from day 7 to day 14 after infection of Tg and non-Tg mice with *C. neoformans*, and absolute numbers of these cell populations extracted from the lungs were not significantly diminished in the Tg mice. Dendritic cells in CD4C/HIV^{MutA} Tg mice have an immature phenotype, with low expression of major histocompatibility complex (MHC) class II and costimulatory molecules and a decreased capacity to present antigen *in vitro* (20, 27). In view of the defective production of MCP-1 in the Tg mice, dendritic cells could potentially have failed to accumulate in the lungs in response to *C. neoformans* infection because of defective CCR2-mediated recruitment and differentiation of monocytes (46). Preserved production of other CCR2 agonists, such as MCP-2 and MCP-3, may have compensated for the defective production of MCP-1. Because dendritic cells and alveolar macrophages play a critical role in the early innate protective host response against *C. neoformans* (71) and are associated with natural resistance to progressive infection (62), it is likely that functional defects of these cell populations also contributed to the increased susceptibility of the Tg mice to *C. neoformans* infection. Blood monocytes and alveolar macrophages from HIV-infected patients have impaired fungistatic activity against *C. neoformans* (72–76).

In summary, the present findings clearly demonstrate that HIV-1 transgene expression consistently augments susceptibility to *C. neoformans* but not *C. gattii* infection, and it reduces the pulmonary inflammatory cell response by both depletion of immune cells and diminished production of chemokines. In the absence of this protective host response in Tg mice, the greater capsule thickness of *C. neoformans* than that of *C. gattii* *in vivo* may become a primary determinant of the host-pathogen interaction and result in selectively enhanced virulence of *C. neoformans*, considering that both species qualitatively share all of the known major *C. neoformans* virulence traits (7, 77).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (grant MOP-93597). Kassandre Leongson and Mathieu Goupil are recipients of a studentship award from the University of Montreal.

We thank Marie-Andrée Laniel for support in maintaining the Tg

mouse colony, Christian Charbonneau for assistance with photomicrography, and Miguel Chagnon for statistical analysis.

REFERENCES

- Park BJ, Wannemuehler KA, Marston BJ, Govender N, Pappas PG, Chiller TM. 2009. Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. *AIDS* 23:525–530.
- Bodasing N, Seaton RA, Shankland GS, Kennedy D. 2004. Cryptococcus neoformans var. gattii meningitis in an HIV-positive patient: first observation in the United Kingdom. *J. Infect.* 49:253–255.
- Chaturvedi S, Dyavaiah M, Larsen RA, Chaturvedi V. 2005. Cryptococcus gattii in AIDS patients, southern California. *Emerg. Infect. Dis.* 11:1686–1692.
- Hoang LM, Maguire JA, Doyle P, Fyfe M, Roscoe DL. 2004. Cryptococcus neoformans infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997–2002): epidemiology, microbiology and histopathology. *J. Med. Microbiol.* 53:935–940.
- Karstaedt AS, Crewe-Brown HH, Dromer F. 2002. Cryptococcal meningitis caused by Cryptococcus neoformans var. gattii, serotype C, in AIDS patients in Soweto, South Africa. *Med. Mycol.* 40:7–11.
- Morgan J, McCarthy KM, Gould S, Fan K, Arthington-Skaggs B, Iqbal N, Stamey K, Hajjeh RA, Brandt ME, Gauteng Cryptococcal Surveillance Initiative Group. 2006. Cryptococcus gattii infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002–2004. *Clin. Infect. Dis.* 43:1077–1080.
- Sorrell TC. 2001. Cryptococcus neoformans variety gattii. *Med. Mycol.* 39:155–168.
- Bovers M, Hagen F, Kuramae EE, Hoogveld HL, Dromer F, St-Germain G, Boekhout T. 2008. AIDS patient death caused by novel Cryptococcus neoformans × *C. gattii* hybrid. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1105–1108.
- St-Germain G, Noel G, Chung KJ. 1988. Disseminated cryptococcosis due to Cryptococcus neoformans variety gattii in a Canadian patient with AIDS. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 7:587–588.
- Galanis E, Hoang L, Kibsey P, Morshed M, Phillips P. 2009. Clinical presentation, diagnosis and management of Cryptococcus gattii cases: lessons learned from British Columbia. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* 20:23–28.
- Kidd SE, Hagen F, Tschärke RL, Huynh M, Bartlett KH, Fyfe M, MacDougall L, Boekhout T, Kwon-Chung KJ, Meyer W. 2004. A rare genotype of Cryptococcus gattii caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:17258–17263.
- Galanis E, MacDougall L. 2010. Epidemiology of Cryptococcus gattii, British Columbia, Canada, 1999–2007. *Emerg. Infect. Dis.* 16:251–257.
- Byrnes EJ, 3rd, Bildfell RJ, Frank SA, Mitchell TG, Marr KA, Heitman J. 2009. Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of Cryptococcus gattii infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States. *J. Infect. Dis.* 199:1081–1086.
- Datta K, Bartlett KH, Baer R, Byrnes E, Galanis E, Heitman J, Hoang L, Leslie MJ, MacDougall L, Magill SS, Morshed MG, Marr KA, Cryptococcus gattii Working Group of the Pacific Northwest. 2009. Spread of Cryptococcus gattii into Pacific Northwest region of the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1185–1191.
- Fyfe M, MacDougall L, Romney M, Starr M, Pearce M, Mak S, Mithani S, Kibsey P. 2008. Cryptococcus gattii infections on Vancouver Island, British Columbia, Canada: emergence of a tropical fungus in a temperate environment. *Can. Commun. Dis. Rep.* 34:1–12.
- Chen S, Sorrell T, Nimmo G, Speed B, Currie B, Ellis D, Marriott D, Pfeiffer T, Parr D, Byth K. 2000. Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to Cryptococcus neoformans in Australia and New Zealand. *Clin. Infect. Dis.* 31:499–508.
- Cheng PY, Sham A, Kronstad JW. 2009. Cryptococcus gattii isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than Cryptococcus neoformans. *Infect. Immun.* 77:4284–4294.
- de Repentigny L, Aumont F, Ripeau JS, Fiorillo M, Kay DG, Hanna Z, Jolicoeur P. 2002. Mucosal candidiasis in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1. *J. Infect. Dis.* 185:1103–1114.
- Hanna Z, Kay DG, Rebai N, Guimond A, Jothy S, Jolicoeur P. 1998. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 95:163–175.
- Poudrier J, Weng X, Kay DG, Hanna Z, Jolicoeur P. 2003. The AIDS-

- like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with accumulation of immature CD11b^{Hi} dendritic cells. *J. Virol.* 77:11733–11744.
21. Poudrier J, Weng X, Kay DG, Pare G, Calvo EL, Hanna Z, Kosco-Vilbois MH, Jolicoeur P. 2001. The AIDS disease of CD4C/HIV transgenic mice shows impaired germinal centers and autoantibodies and develops in the absence of IFN- γ and IL-6. *Immunity* 15:173–185.
 22. Priceputu E, Rodrigue I, Chrobak P, Poudrier J, Mak TW, Hanna Z, Hu C, Kay DG, Jolicoeur P. 2005. The Nef-mediated AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with increased Fas/FasL expression on T cells and T-cell death but is not prevented in Fas-, FasL-, tumor necrosis factor receptor 1-, or interleukin-1 β -converting enzyme-deficient or Bcl2-expressing transgenic mice. *J. Virol.* 79:6377–6391.
 23. Weng X, Priceputu E, Chrobak P, Poudrier J, Kay DG, Hanna Z, Mak TW, Jolicoeur P. 2004. CD4⁺ T cells from CD4C/HIVNef transgenic mice show enhanced activation in vivo with impaired proliferation in vitro but are dispensable for the development of a severe AIDS-like organ disease. *J. Virol.* 78:5244–5257.
 24. Kay DG, Yue P, Hanna Z, Jothy S, Tremblay E, Jolicoeur P. 2002. Cardiac disease in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus-1 nef in cells of the immune system. *Am. J. Pathol.* 161:321–335.
 25. de Repentigny L, Lewandowski D, Jolicoeur P. 2004. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* 17:729–759.
 26. Goupil M, Trudelle EB, Dugas V, Racicot-Bergeron C, Aumont F, Senechal S, Hanna Z, Jolicoeur P, de Repentigny L. 2009. Macrophage-mediated responses to *Candida albicans* in mice expressing the human immunodeficiency virus type 1 transgene. *Infect. Immun.* 77:4136–4149.
 27. Lewandowski D, Marquis M, Aumont F, Lussier-Morin AC, Raymond M, Senechal S, Hanna Z, Jolicoeur P, de Repentigny L. 2006. Altered CD4⁺ T cell phenotype and function determine the susceptibility to mucosal candidiasis in transgenic mice expressing HIV-1. *J. Immunol.* 177:479–491.
 28. Marquis M, Lewandowski D, Dugas V, Aumont F, Senechal S, Jolicoeur P, Hanna Z, de Repentigny L. 2006. CD8⁺ T cells but not polymorphonuclear leukocytes are required to limit chronic oral carriage of *Candida albicans* in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1. *Infect. Immun.* 74:2382–2391.
 29. Litvintseva AP, Mitchell TG. 2009. Most environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) are not lethal for mice. *Infect. Immun.* 77:3188–3195.
 30. Rivera J, Feldmesser M, Cammer M, Casadevall A. 1998. Organ-dependent variation of capsule thickness in *Cryptococcus neoformans* during experimental murine infection. *Infect. Immun.* 66:5027–5030.
 31. Feldmesser M, Kress Y, Novikoff P, Casadevall A. 2000. *Cryptococcus neoformans* is a facultative intracellular pathogen in murine pulmonary infection. *Infect. Immun.* 68:4225–4237.
 32. Feldmesser M, Tucker S, Casadevall A. 2001. Intracellular parasitism of macrophages by *Cryptococcus neoformans*. *Trends Microbiol.* 9:273–278.
 33. Feldmesser M, Kress Y, Casadevall A. 2001. Dynamic changes in the morphology of *Cryptococcus neoformans* during murine pulmonary infection. *Microbiology* 147:2355–2365.
 34. Hoag KA, Street NE, Huffnagle GB, Lipscomb MF. 1995. Early cytokine production in pulmonary *Cryptococcus neoformans* infections distinguishes susceptible and resistant mice. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13:487–495.
 35. Kleinschek MA, Muller U, Brodie SJ, Stenzel W, Kohler G, Blumenschein WM, Straubinger RK, McClanahan T, Kastelein RA, Alber G. 2006. IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12. *J. Immunol.* 176:1098–1106.
 36. Muller U, Stenzel W, Kohler G, Werner C, Polte T, Hansen G, Schutze N, Straubinger RK, Blessing M, McKenzie AN, Brombacher F, Alber G. 2007. IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 179:5367–5377.
 37. Voelz K, Lammas DA, May RC. 2009. Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 77:3450–3457.
 38. Gal AA, Koss MN, Hawkins J, Evans S, Einstein H. 1986. The pathology of pulmonary cryptococcal infections in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 110:502–507.
 39. McDonnell JM, Hutchins GM. 1985. Pulmonary cryptococcosis. *Hum. Pathol.* 16:121–128.
 40. Torda A, Kumar RK, Jones PD. 2001. The pathology of human and murine pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*. *Pathology* 33:475–478.
 41. Ngamskulrungron P, Chang Y, Sionov E, Kwon-Chung KJ. 2012. The primary target organ of *Cryptococcus gattii* is different from that of *Cryptococcus neoformans* in a murine model. *mBio* 3:e00103–12. doi:10.1128/mBio.00103-12.
 42. Huffnagle GB, Strieter RM, Standiford TJ, McDonald RA, Burdick MD, Kunkel SL, Toews GB. 1995. The role of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4⁺ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Immunol.* 155:4790–4797.
 43. Traynor TR, Herring AC, Dorf ME, Kuziel WA, Toews GB, Huffnagle GB. 2002. Differential roles of CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 in the development of T1 immunity. *J. Immunol.* 168:4659–4666.
 44. Osterholzer JJ, Chen GH, Olszewski MA, Zhang YM, Curtis JL, Huffnagle GB, Toews GB. 2011. Chemokine receptor 2-mediated accumulation of fungicidal exudate macrophages in mice that clear cryptococcal lung infection. *Am. J. Pathol.* 178:198–211.
 45. Osterholzer JJ, Curtis JL, Polak T, Ames T, Chen GH, McDonald R, Huffnagle GB, Toews GB. 2008. CCR2 mediates conventional dendritic cell recruitment and the formation of bronchovascular mononuclear cell infiltrates in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 181:610–620.
 46. Osterholzer JJ, Chen GH, Olszewski MA, Curtis JL, Huffnagle GB, Toews GB. 2009. Accumulation of CD11b⁺ lung dendritic cells in response to fungal infection results from the CCR2-mediated recruitment and differentiation of Ly-6Chigh monocytes. *J. Immunol.* 183:8044–8053.
 47. Qiu Y, Zeltzer S, Zhang Y, Wang F, Chen GH, Dayrit J, Murdock BJ, Bhan U, Toews GB, Osterholzer JJ, Standiford TJ, Olszewski MA. 2012. Early induction of CCL7 downstream of TLR9 signaling promotes the development of robust immunity to cryptococcal infection. *J. Immunol.* 188:3940–3948.
 48. Huffnagle GB, Traynor TR, McDonald RA, Olszewski MA, Lindell DM, Herring AC, Toews GB. 2000. Leukocyte recruitment during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection. *Immunopharmacology* 48:231–236.
 49. Huffnagle GB, Strieter RM, McNeil LK, McDonald RA, Burdick MD, Kunkel SL, Toews GB. 1997. Macrophage inflammatory protein-1 α (MIP-1 α) is required for the efferent phase of pulmonary cell-mediated immunity to a *Cryptococcus neoformans* infection. *J. Immunol.* 159:318–327.
 50. Huffnagle GB, Toews GB, Burdick MD, Boyd MB, McAllister KS, McDonald RA, Kunkel SL, Strieter RM. 1996. Afferent phase production of TNF- α is required for the development of protective T cell immunity to *Cryptococcus neoformans*. *J. Immunol.* 157:4529–4536.
 51. Kawakami K, Tohyama M, Teruya K, Kudeken N, Xie Q, Saito A. 1996. Contribution of interferon- γ in protecting mice during pulmonary and disseminated infection with *Cryptococcus neoformans*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13:123–130.
 52. Arora S, Hernandez Y, Erb-Downward JR, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. 2005. Role of IFN- γ in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis. *J. Immunol.* 174:6346–6356.
 53. Retini C, Vecchiarelli A, Monari C, Tascini C, Bistoni F, Kozel TR. 1996. Capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans* induces pro-inflammatory cytokine release by human neutrophils. *Infect. Immun.* 64:2897–2903.
 54. Curtis JL, Huffnagle GB, Chen GH, Warnock ML, Gyetko MR, McDonald RA, Scott PJ, Toews GB. 1994. Experimental murine pulmonary cryptococcosis. Differences in pulmonary inflammation and lymphocyte recruitment induced by two encapsulated strains of *Cryptococcus neoformans*. *Lab. Invest.* 71:113–126.
 55. Voelz K, May RC. 2010. Cryptococcal interactions with the host immune system. *Eukaryot. Cell* 9:835–846.
 56. Okagaki LH, Strain AK, Nielsen JN, Charlier C, Baltes NJ, Chretien F, Heitman J, Dromer F, Nielsen K. 2010. Cryptococcal cell morphology

- affects host cell interactions and pathogenicity. *PLoS Pathog.* 6:e1000953. doi:10.1371/journal.ppat.1000953.
57. Zaragoza O, Garcia-Rodas R, Nosanchuk JD, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL, Casadevall A. 2010. Fungal cell gigantism during mammalian infection. *PLoS Pathog.* 6:e1000945. doi:10.1371/journal.ppat.1000945.
 58. Okagaki LH, Nielsen K. 2012. Titan cells confer protection from phagocytosis in *Cryptococcus neoformans* infections. *Eukaryot. Cell* 11:820–826.
 59. Casadevall A. 2010. Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse? *J. Clin. Invest.* 120:1389–1392.
 60. Hernandez Y, Arora S, Erb-Downward JR, McDonald RA, Toews GB, Huffnagle GB. 2005. Distinct roles for IL-4 and IL-10 in regulating T2 immunity during allergic bronchopulmonary mycosis. *J. Immunol.* 174:1027–1036.
 61. Kawakami K, Hossain Qureshi M, Zhang T, Koguchi Y, Xie Q, Kurimoto M, Saito A. 1999. Interleukin-4 weakens host resistance to pulmonary and disseminated cryptococcal infection caused by combined treatment with interferon-gamma-inducing cytokines. *Cell. Immunol.* 197:55–61.
 62. Guillot L, Carroll SF, Homer R, Qureshi ST. 2008. Enhanced innate immune responsiveness to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with resistance to progressive infection. *Infect. Immun.* 76:4745–4756.
 63. Huffnagle GB, Lipscomb MF, Lovchik JA, Hoag KA, Street NE. 1994. The role of CD4+ and CD8+ T cells in the protective inflammatory response to a pulmonary cryptococcal infection. *J. Leukoc. Biol.* 55:35–42.
 64. Huffnagle GB, Yates JL, Lipscomb MF. 1991. Immunity to a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection requires both CD4+ and CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 173:793–800.
 65. Huffnagle GB, Yates JL, Lipscomb MF. 1991. T cell-mediated immunity in the lung: a *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection model using SCID and athymic nude mice. *Infect. Immun.* 59:1423–1433.
 66. Wang JP, Lee CK, Akalin A, Finberg RW, Levitz SM. 2011. Contributions of the MyD88-dependent receptors IL-18R, IL-1R, and TLR9 to host defenses following pulmonary challenge with *Cryptococcus neoformans*. *PLoS One* 6:e26232. doi:10.1371/journal.pone.0026232.
 67. Mogensen EG, Janbon G, Chaloupka J, Steegborn C, Fu MS, Moyrand F, Klengel T, Pearson DS, Geeves MA, Buck J, Levin LR, Muhlschlegel FA. 2006. *Cryptococcus neoformans* senses CO₂ through the carbonic anhydrase Can2 and the adenylyl cyclase Cac1. *Eukaryot. Cell* 5:103–111.
 68. Swingler S, Zhou J, Swingler C, Dauphin A, Greenough T, Jolicoeur P, Stevenson M. 2008. Evidence for a pathogenic determinant in HIV-1 Nef involved in B cell dysfunction in HIV/AIDS. *Cell Host Microbe* 4:63–76.
 69. Jung WH, Sham A, Lian T, Singh A, Kosman DJ, Kronstad JW. 2008. Iron source preference and regulation of iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. *PLoS Pathog.* 4:e45. doi:10.1371/journal.ppat.0040045.
 70. Lian T, Simmer MI, D'Souza CA, Steen BR, Zuyderduyn SD, Jones SJ, Marra MA, Kronstad JW. 2005. Iron-regulated transcription and capsule formation in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Mol. Microbiol.* 55:1452–1472.
 71. Osterholzer JJ, Milam JE, Chen GH, Toews GB, Huffnagle GB, Olszewski MA. 2009. Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 77:3749–3758.
 72. Reardon CC, Kim SJ, Wagner RP, Kozziel H, Kornfeld H. 1996. Phagocytosis and growth inhibition of *Cryptococcus neoformans* by human alveolar macrophages: effects of HIV-1 infection. *AIDS* 10:613–618.
 73. Jeong MH, Reardon CC, Levitz SM, Kornfeld H. 2000. Human immunodeficiency virus type 1 infection of alveolar macrophages impairs their innate fungicidal activity. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162:966–970.
 74. Cameron ML, Granger DL, Matthews TJ, Weinberg JB. 1994. Human immunodeficiency virus (HIV)-infected human blood monocytes and peritoneal macrophages have reduced anticryptococcal activity whereas HIV-infected alveolar macrophages retain normal activity. *J. Infect. Dis.* 170:60–67.
 75. Harrison TS, Kornfeld H, Levitz SM. 1995. The effect of infection with human immunodeficiency virus on the anticryptococcal activity of lymphocytes and monocytes. *J. Infect. Dis.* 172:665–671.
 76. Harrison TS, Levitz SM. 1997. Mechanisms of impaired anticryptococcal activity of monocytes from donors infected with human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* 176:537–540.
 77. Kronstad JW, Attarian R, Cadieux B, Choi J, D'Souza CA, Griffiths EJ, Geddes JM, Hu G, Jung WH, Kretschmer M, Saikia S, Wang J. 2011. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. *Nat. Rev. Microbiol.* 9:193–203.

Nystatin nanosizing enhances *in vitro* and *in vivo* antifungal activity against *Candida albicans*

Alexandre Melkoumov¹, Mathieu Goupil², Fatiha Louhichi³, Martine Raymond³, Louis de Repentigny² and Grégoire Leclair^{1*}

¹Faculty of Pharmacy, Université de Montréal, H3C 3J7 Montreal, Canada; ²Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Université de Montréal, H3C 3J7 Montreal, Canada; ³Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, and Institute for Research in Immunology and Cancer, Université de Montréal, H3C 3J7 Montreal, Canada

*Corresponding author.

Received 23 January 2013; returned 14 February 2013; revised 18 March 2013; accepted 22 March 2013

Objectives: In this study, we developed a nanoparticulate nystatin formulation and performed a comparative evaluation against a commercial nystatin preparation of its *in vitro* and *in vivo* antifungal activities.

Methods: A nystatin nanosuspension was prepared from a commercially available suspension by wet-media milling. The nanosuspension was characterized for particle size by laser diffraction and assayed for content by HPLC. Its *in vitro* activity was evaluated against *Candida albicans* strains SC5314 and LAM-1 (12.5–5000 µg/mL) using an agar plate assay and its *in vivo* efficacy was evaluated using a murine model of oral candidiasis. Briefly, DBA/2 mice were immunosuppressed with cortisone acetate, orally infected with *C. albicans* strain LAM-1, and treated for 14 days with conventional nystatin suspension, nystatin nanosuspension or saline control. Efficacy endpoints were oral fungal burden, mouse survival and organ histopathology. A single-dose pharmacokinetic study was also performed.

Results: The median particle size of the nystatin suspension was reduced from 6577 to 137 nm. The HPLC assay demonstrated a nystatin content of 98.7% ± 0.8% of the label claim. *In vitro* activity was superior to that of the conventional nystatin suspension at 100–5000 µg/mL concentrations. Beginning on day 3 of treatment, lower oral burdens of *C. albicans* were found in the nanosuspension group compared with the suspension and control groups. Mouse survival was also superior in the nanosuspension group. No systemic absorption was observed.

Conclusions: Taken together, these data reveal that nanonization of nystatin provides a novel approach to enhancing its efficacy in the treatment of oral candidiasis.

Keywords: oral candidiasis, nanosuspensions, drug delivery

Introduction

Oropharyngeal candidiasis (OPC) is a common human fungal infection characterized by an overgrowth of *Candida* species in the superficial epithelium of the oral mucosa.^{1,2} The vast majority of these infections are caused by *Candida albicans*. Immunocompromised patients, including those with HIV infection or cancer, are at enhanced risk of OPC.^{2–4} In addition, OPC can be triggered in healthy patients by transient risk factors such as antibiotic or corticosteroid treatment.⁵ The infection can be complicated by oesophageal candidiasis and, in the worst cases, fungal septicaemia.¹ Although it is infrequent, disseminated candidiasis has a mortality rate of 47%.^{4,6}

Nystatin and fluconazole are the most widely employed antifungal agents in the treatment of OPC. Nystatin is a polyene

antifungal that possesses excellent *in vitro* fungicidal activity against *C. albicans* spp.⁷ Kovacic and Cooks⁸ suggested that the mechanism of action of polyene antifungals is 2-fold. Firstly, polyenes bind to ergosterol, a component of *C. albicans* membranes, resulting in the formation of transmembrane pores, leakage of ions and sequestration of ergosterol. Secondly, induction of oxidative stress and damage also contribute to polyene antifungal activity.^{8,9}

Poorly soluble nystatin is formulated as a suspension that patients swoosh and swirl in their buccal cavity, and either spit out or swallow.^{10,11} The drug is not bioavailable after oral administration and is eliminated in the faeces.¹⁰ Nystatin suspension has few side effects and no drug interactions have been reported;¹⁰ hence it remains a treatment of choice.¹¹ Topical administration of nystatin provides sufficient efficacy in treating

OPC in immunocompetent patients. However, the clinical cure rate of oral candidiasis in immunocompromised HIV patients is only 52%, compared with 87% for fluconazole.¹² Fluconazole, a systemically acting triazole antifungal, can cause adverse effects – including hepatic enzyme elevation and drug interactions – by inhibiting human cytochrome P450.^{13,14} In addition, cases of resistance to polyene drugs such as nystatin are very rare, while continuous fluconazole therapy may lead to azole resistance in *C. albicans*.^{15,16}

Nanosizing is an attractive and novel approach to improving the efficacy of nystatin. Several marketed products incorporate this technology to improve the oral bioavailability of poorly soluble drugs.^{17,18} A limited number of studies have been conducted to assess the *in vivo* antimicrobial activity of nanoformulations of amphotericin B, a polyene antifungal structurally similar to nystatin.^{17–20} Interestingly, these studies demonstrated enhanced efficacy of amphotericin B nanoformulations in murine models of visceral leishmaniasis, amoebic encephalitis, cryptococcal meningitis, and pulmonary and disseminated aspergillosis. Other studies, using an agar plate assay, have demonstrated increased *in vitro* bactericidal activity of silver nanoparticles.^{21–23} No study has been conducted to evaluate the efficacy of polyene nanosuspensions on infections with *Candida* spp.

Nystatin exerts its effect when it comes into direct contact with *Candida* after topical application. When administered as an oral suspension, it is rapidly cleared by saliva.²⁴ Mucoadhesive formulations have therefore been developed in an attempt to prolong contact with the oral mucosa.^{25,26} However, the tolerability of such formulations, especially among the paediatric population, has yet to be demonstrated. Furthermore, nystatin produces a biologically significant post-antifungal effect (PAFE).²⁷ Indeed, 30 min exposure of *C. albicans* to nystatin at 25%–100% of the MIC will cause a PAFE of 5–6 h.²⁸

Based on previous reports on amphotericin B and silver nanoparticles, we hypothesized that nanosizing would improve the efficacy of nystatin suspension. Here, we show that nanosized nystatin produces superior *in vitro* growth inhibition of *C. albicans* compared with conventional nystatin suspension, and is more efficacious in the treatment of experimental OPC in immunocompromised mice.

Materials and methods

Materials and *Candida* strains

Nystatin oral suspension USP was obtained from Pharmascience Inc. (Montreal, Canada; PMS-Nystatin, 100 000 IU/mL, Lot 420122). Nystatin USP powder was purchased from Medisca Inc. (Montreal, Canada, Lot 29303/M). All chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). All solvents were purchased from Laboratoire Mat (Montreal, Canada). Chemicals and solvents were used without further purification. Sterile calcium alginate-tipped applicators (Calgiswabs) were purchased from Puritan (Guilford, ME, USA).

Unless otherwise specified, water was first distilled and purified using a Milli-Q system (Millipore, Billerica, MA, USA).

C. albicans strain SC5314 was originally isolated from a patient with disseminated candidiasis, and served as reference for the *C. albicans* genome sequencing project.^{29,30} *C. albicans* strain LAM-1 (serotype A) was originally isolated from the blood of a patient with systemic candidiasis.³¹

Preparation of nystatin nanosuspensions

Commercial nystatin oral suspension USP (60, 30 or 24 mL; 100 000 IU/mL) was diluted as necessary with water (0, 30 or 36 mL) to final concentrations of 100 000, 50 000 or 40 000 IU/mL in a final volume of 60 mL. The resulting suspension was wet milled with yttria-stabilized zirconia beads (0.8 mm, 144 mL) in a DynoMill ML (Glen Mills, Clifton, NJ, USA) equipped with a 300 mL milling chamber (4 h, 2389 rpm, 5°C). Control suspensions were prepared by diluting the commercial nystatin oral suspension (30 mL) with water (30 mL) to a final concentration of 50 000 IU/mL.

Characterization of nanosuspensions

Suspensions were assayed for nystatin by HPLC (Prominence HPLC, Shimadzu, Tokyo, Japan) as previously described.³² Particle size distribution was analysed in water at 22°C by laser diffraction (LS 13 320, Beckman Coulter, Mississauga, Canada).

In vitro antifungal activity

C. albicans cells were routinely grown at 30°C in yeast peptone dextrose (YPD; 1% yeast extract, 2% Bacto peptone, 2% dextrose plus 2% agar for solid medium). *C. albicans* SC5314 cells were resuspended in liquid YPD medium to an OD₆₀₀ of 0.1, and 150 µL of the cell suspension was spread on YPD Petri dishes. Whatman 3 mm CHR paper discs were then placed on each dish, and 12.5 µL of nystatin suspension or nanosuspension was added on top of the discs. The plates were incubated at 30°C, and growth inhibition diameters were measured at 18, 24 and 48 h. Eight concentrations of nystatin (12.5–5000 µg/mL) were each replicated nine times. The same tests were also performed in triplicate using *C. albicans* strain LAM-1.

Efficacy in murine oral candidiasis

Animal experiments were approved by the Animal Care Committee of the Université de Montréal, and conducted as described.³³ Sixty male DBA/2 mice, 10 weeks old, were housed in sterilized individual cages equipped with air filter hoods, supplied with sterile water and fed with sterile mouse chow. Animals were immunosuppressed with cortisone acetate (225 mg/kg subcutaneously) on days –1, +1 and +3 of *C. albicans* inoculation.³³ Oral inoculation with *C. albicans* LAM-1, assessments for signs of morbidity, and longitudinal quantification of *C. albicans* in the oral cavities of individual mice were conducted as described previously.³⁴ Animals reaching predetermined morbidity endpoints were designated pre-mortem and euthanized with ketamine.

The animals were divided into three groups ($n=20$ per group): the first was treated with commercial nystatin suspension, the second with nystatin nanosuspension and the third with PBS as a negative control. Nystatin (80 000 IU/kg in 0.1 mL PBS) or PBS (0.1 mL) was administered intra-orally twice daily for 14 days, beginning 1 day after oral inoculation of *C. albicans*. The suspension was topically administered into the oral cavity using a 1.0 mL syringe equipped with a gavage needle. The mice were immobilized during dosing in a supine position without anaesthesia for 1 min, allowing the animals to ‘gargle’ the suspension and then swallow it. After completion of the 14 day treatment, the mice were monitored once daily to evaluate survival. In addition, to evaluate the extent of mucosal candidiasis and to assess the possible systemic spread of *C. albicans* in treated and untreated mice, histopathological examination of the tongue, kidneys and heart was performed on tissues harvested from mice ($n=3$ per group) reaching morbidity endpoints on day 10 after infection. Tissue sections were stained with haematoxylin, phloxine and safranin, or by the Gomori–Grocott methenamine silver procedure.

Drug absorption

The extent of systemic absorption of nystatin after oral administration was evaluated using a fixed oral dose of 300 000 IU/kg of nystatin nanosuspension (three mice) or of commercial nystatin suspension (two mice). Whole blood was collected 4 h post-dose, and nystatin was assayed by HPLC.³²

Statistical analysis

Statistical analysis was carried out using SPSS version 20.0 software (IBM, Chicago, IL, USA). For *in vitro* activity results, an unpaired two-tailed Student's *t*-test was used to determine statistical differences. Oral burdens of *C. albicans* were compared using a Welch one-way analysis of variance followed by a Games–Howell test for multiple comparisons of unequal variances. Kaplan–Meier modelling and a log-rank test were used to compare survival functions. *P* values for multiple comparisons were adjusted using the Bonferroni correction. A *P* value of ≤ 0.05 was considered significant.

Results

Nanosuspension characterization

A nanosuspension is characterized by its particle size distribution. Ninety percent of the particles must be smaller than 400 nm ($x_{90} < 400$ nm) and 50% of the particles must be smaller than 200 nm ($x_{50} < 200$ nm).³⁵ As shown in Table 1, adequate nanosuspensions were obtained when the commercial product was milled at concentrations of 50 000 and 40 000 IU/mL.

The relative nystatin content of the nanosuspensions, compared with before milling, was $98.7\% \pm 0.8\%$. The 50 000 IU/mL nanosuspension was used to evaluate *in vivo* efficacy because it had the highest concentration of drug while still maintaining adequate particle size.

In vitro antifungal activity

Evaluating the *in vitro* activity of a novel formulation of an existing antifungal is a challenging task because current antifungal

Table 1. Particle size distribution of nystatin formulations analysed by laser diffraction.

Formulation/concentration (IU/mL)	Particle size (nm) ^a		
	x_{10} ^b	x_{50} ^c	x_{90} ^d
Commercial suspension			
100 000	1392 \pm 303	6577 \pm 2226	24 897 \pm 9318
Nanosuspension			
100 000	88 \pm 1	241 \pm 3	794 \pm 4
50 000	75 \pm 1	137 \pm 1	365 \pm 2
40 000	96 \pm 1	142 \pm 3	237 \pm 8

^aData are means \pm standard deviations.

^bParticle size corresponding to 10% of the cumulative undersize distribution.

^cMedian particle size (i.e. 50% of the particles are smaller and 50% of the particles are larger).

^dParticle size corresponding to 90% of the cumulative undersize distribution.

susceptibility testing methods focus on molecular activity.³⁶ Antifungal susceptibility testing can be performed in liquid or on solid media.^{36,37} A solid medium method has previously been reported for the evaluation of the bactericidal activity of silver nanoparticles.^{21–23} Nystatin's solubility (about 50 μ g/mL) is higher than its MIC (about 2 mg/L). Therefore, a liquid medium cannot be used because the required dilution would actually dissolve the particles. No discrimination between the suspensions can be achieved once their particles are dissolved into solutions. Consequently, *in vitro* activity was determined using an agar plate assay.

When tested against *C. albicans* SC5314, the nystatin nanosuspension produced significantly greater growth inhibition diameters at concentrations ranging from 100 to 5000 μ g/mL (Figure 1a). At lower concentrations (12.5–50 μ g/mL) no growth inhibition of *C. albicans* was observed and therefore a comparison of the activity of the preparations could not be made (Figure 1b). Increases in growth inhibition diameters were not proportional to increasing nystatin concentrations, consistent with the agar plate assays. Similar results were obtained using *C. albicans* strain LAM-1 (data not shown).

In vivo efficacy

At day 2 after oral inoculation of *C. albicans*, one day after beginning treatment, the nystatin nanosuspension significantly reduced the oral burden of *C. albicans* compared with the PBS control (Figure 2). This early response to treatment was not observed with the commercial nystatin suspension. Indeed, a significant reduction in oral *C. albicans* burden in response to commercial nystatin suspension was delayed to the fifth day of treatment (Figure 2). Afterwards, both treatments were statistically superior to PBS through to day 9 of treatment, after which statistical analysis of *C. albicans* oral burdens was not performed due to mouse attrition. Of particular interest, the nystatin nanosuspension was significantly more efficacious than the commercial suspension in reducing the oral burden of *C. albicans* on treatment days 3, 4, 5, 6, 8 and 9 (Figure 2).

Mice were assessed for survival, and survivors were euthanized 32 days after oral inoculation of *C. albicans* (Figure 3). Mice treated with the nystatin nanosuspension had improved survival compared with animals receiving commercial nystatin suspension ($P=0.003$) or PBS ($P<0.001$). Although mice treated with the commercial nystatin suspension showed lower survival than those treated with the nanosuspension, their survival was nevertheless significantly enhanced compared with untreated PBS controls ($P=0.03$) (Figure 3).

Histopathology

Untreated control mice consistently displayed extensive candidal infection of the stratified squamous epithelium of the entire dorsum of the tongue, accompanied by an abundant inflammatory cell infiltrate (Figure 4). In contrast, in mice treated with either commercial nystatin or nystatin nanosuspension, the density of *Candida* hyphae in the epithelium was sharply diminished, and, in limited areas, hyphae were entirely absent (Figure 4). At necropsy, typical *Candida* microabscesses indicative of systemic dissemination were uniformly observed on the surface of the kidneys and heart of all mice, treated or not with either of the nystatin formulations. However, fewer microabscesses (0–5) were observed on tissue

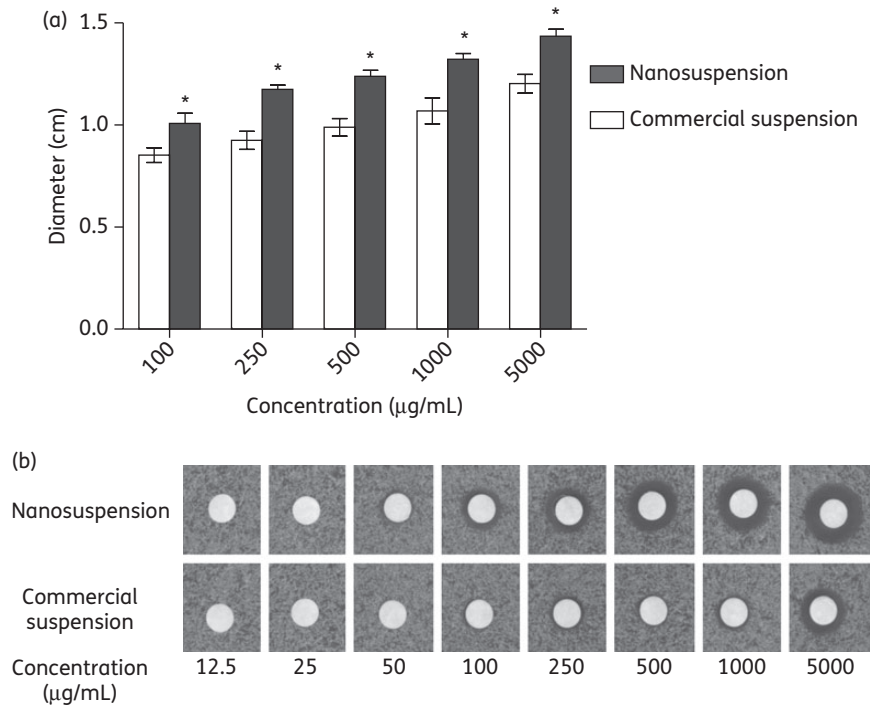


Figure 1. (a) Growth inhibition diameters of *C. albicans* strain SC5314 incubated at 30°C for 18 h in the presence of nystatin nanosuspension or commercial suspension. Data represent means \pm standard deviations of nine independent observations. No growth inhibition was detected at concentrations <100 mg/L (not shown). * P <0.05 compared with commercial nystatin suspension. (b) Representative examples of growth inhibition of *C. albicans* strain SC5314 at the indicated concentrations of nystatin nanosuspension or commercial suspension.

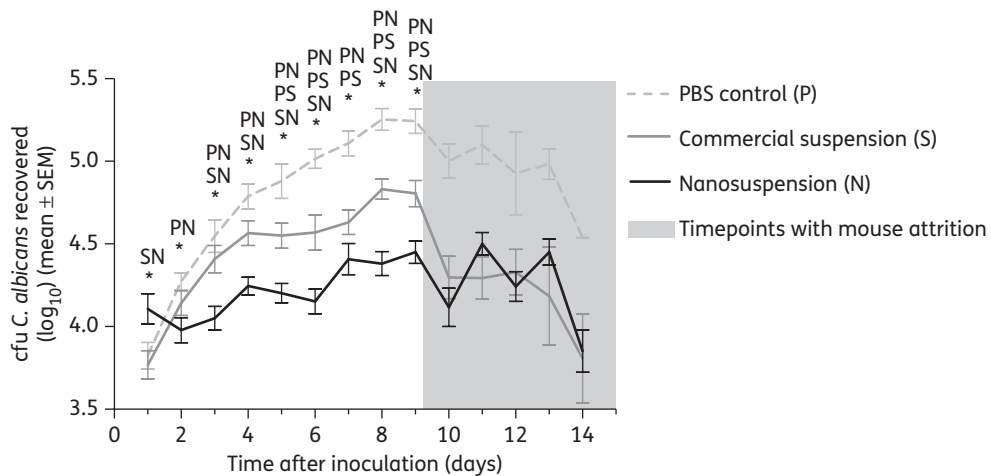


Figure 2. Oral burden of *C. albicans* strain LAM-1 in DBA/2 mice. Animals were immunosuppressed with cortisone acetate on days -1, +1 and +3 of oral *C. albicans* inoculation, and treated intra-orally twice daily with commercial nystatin suspension, nystatin nanosuspension, or PBS as a negative control, beginning one day after inoculation. Mouse attrition began after the day +9 assessment, and statistical analysis was not performed after this timepoint. * P <0.05 for the following comparisons: PN, PBS control versus nystatin nanosuspension; PS, PBS control versus commercial suspension; SN, commercial suspension versus nystatin nanosuspension.

sections of these organs harvested from mice treated with either the commercial nystatin suspension or the nanosuspension, compared with untreated controls (>10). It was not possible to discern commercial nystatin from the nanosuspension due to the qualitative nature of histopathology.

Drug absorption

Nystatin was not detected in whole blood (limit of detection: 1 IU/mL) of mice 4 h after administration of a massive single oral dose of 300 000 IU/kg of commercial nystatin or nystatin nanosuspension.

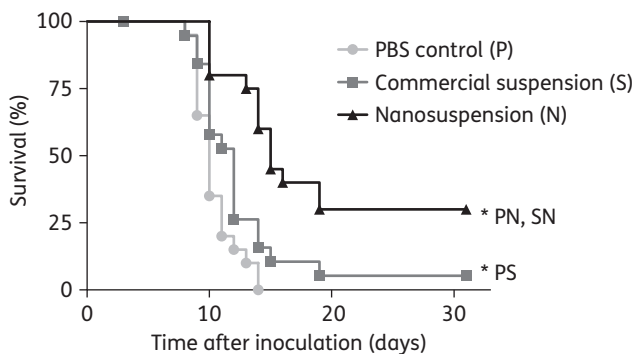


Figure 3. Survival of DBA/2 mice after oral inoculation of *C. albicans* strain LAM-1. Twenty mice per group were treated intra-orally twice daily with commercial nystatin suspension, nystatin nanosuspension, or PBS as a negative control, beginning one day after inoculation. * $P < 0.05$ for the following comparisons: PN, PBS control versus nystatin nanosuspension; PS, PBS control versus commercial suspension; SN, commercial suspension versus nystatin nanosuspension.

Discussion

Nystatin nanosuspensions were obtained by high-energy wet-media milling. The process was simple owing to the few steps required. In addition, no additional ingredients were needed when milling the commercial product. However, it was necessary to dilute the commercial suspension with water to reduce viscosity and facilitate milling. At higher concentrations of nystatin (100 000 IU/mL), particle size was not sufficiently reduced even at a higher milling speed. Nystatin assays demonstrated no degradation of the active pharmaceutical ingredient during the milling process, which can potentially occur during this procedure.

In vitro tests demonstrated greater diameters of growth inhibition of *C. albicans* in the presence of the nystatin nanosuspension compared with the commercial suspension. This increased activity could be explained by one or both of the following mechanisms: (i) particle size reduction facilitated the diffusion on or within the solid medium, resulting in the increased inhibition diameter; (ii) particle size reduction increased the specific surface area of the particles, increasing the intrinsic particle activity of the drug.

Evaluating antifungal efficacy *in vivo* is also potentially challenging because of the limited number of clinically relevant animal models of oral candidiasis suitable for this purpose.^{3,33,34,38,39} No animal model has been used to compare two oral formulations of nystatin. DBA/2 mice immunosuppressed with cortisone acetate were used in this study. These mice are deficient in complement component 5 (C5) and are susceptible to infection with *C. albicans*. Indeed, it has been shown that DBA/2 mice develop greater oral colonization with *C. albicans* than BALB/c mice (not C5 deficient).^{40,41} Although DBA/2 mice are susceptible to *C. albicans* oral colonization they are nevertheless able to clear the infection after 1 week.⁴¹ The mice were therefore immunosuppressed with cortisone acetate to prolong oral carriage of *C. albicans*, thus providing a clinically relevant time course for assessment of antifungal efficacy.³³

In vivo assessment showed superior efficacy of the nystatin nanosuspension in reducing the oral burden of *C. albicans*.

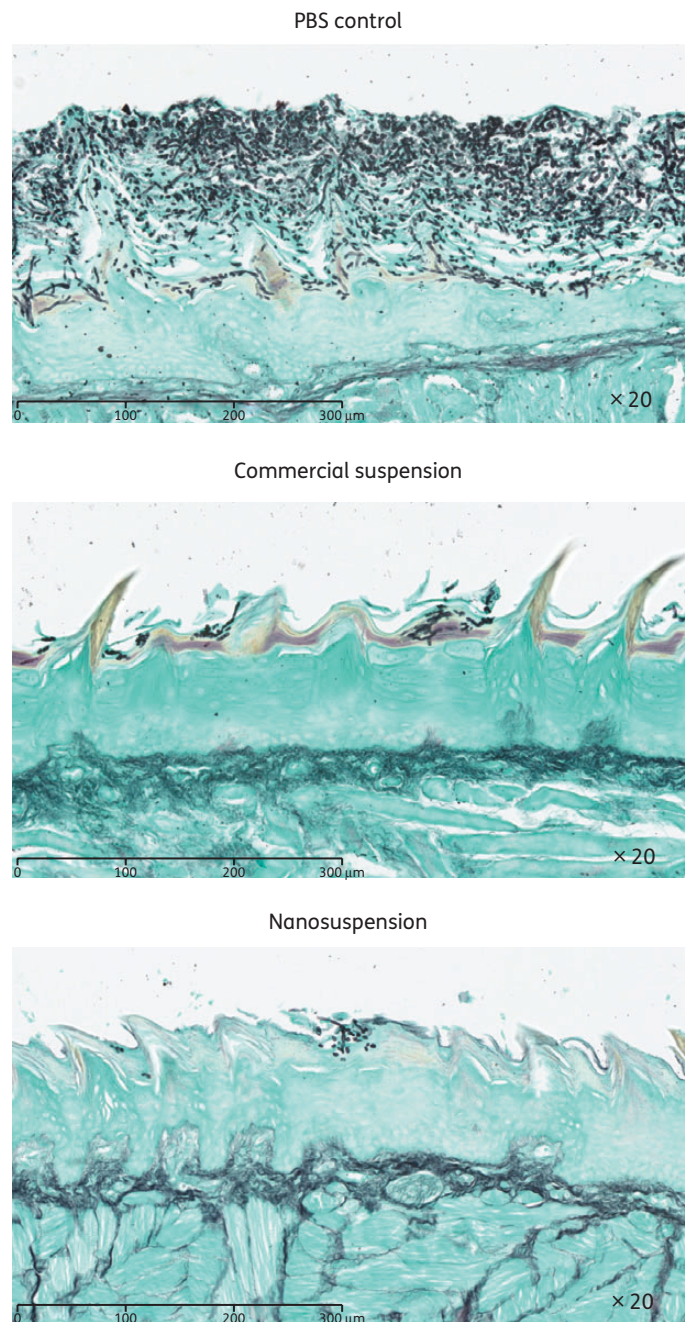


Figure 4. Histopathology of oral candidiasis in DBA/2 mice treated with commercial nystatin suspension, nystatin nanosuspension, or PBS as a negative control. Tissues were stained with Gomori-Grocott methenamine silver. Assessments were performed at day 10 after inoculation with *C. albicans*, and images are representative of three mice per group with consistent results. This figure appears in colour in the online version of JAC and in black and white in the printed version of JAC.

The nanosuspension significantly reduced the oral burden of *C. albicans* as early as 24 h after starting treatment, in contrast to the fifth day of treatment for the commercial suspension, demonstrating a more rapid onset of the *in vivo* response to

treatment. In addition, the nystatin nanosuspension was consistently more efficacious than the commercial suspension in the reduction of fungal burden from day 3 to day 9 of treatment, with the exception of day 7. Increasing the statistical power of the study would most likely also produce a significant difference at this timepoint. Starting on day 10 after inoculation, mouse attrition precluded a meaningful statistical analysis of the oral burden of *C. albicans*. Therefore, mouse survival was used as an endpoint of *in vivo* efficacy from day 10 until the conclusion of the experiment.

Systemic candidiasis was not expected because it was not reported in a previously described model of OPC in mice immunosuppressed with cortisone acetate.³³ It is possible that the *C. albicans* LAM-1 strain is more virulent than the SC5314 and SANK51486 strains used in this previous study, and that the greater susceptibility of DBA/2 mice to *C. albicans* infection compared with ddY mice facilitated systemic dissemination. Mucosal invasion leading to systemic dissemination most likely occurred in the oral cavity, oesophagus or cardiac-atrium fold of the stomach.^{42,43} Mice treated with the nanosuspension had improved survival compared with those treated with the commercial suspension or PBS. This improved survival probably resulted from a greater reduction of *Candida* burden at the mucosal portal of entry in the oral cavity and gastrointestinal tract, because we found that the nystatin nanosuspension is not absorbed after oral administration. This observed reduction in mortality provides a foundation for investigating the potentially added value of antifungal prophylaxis with nystatin nanosuspension in susceptible hosts such as allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients or those undergoing intensive remission-induction or salvage-induction chemotherapy for acute leukaemia, who routinely receive systemic antifungal prophylaxis against *Candida* infection.

Assessment of absorption following oral administration of the nystatin formulations was performed. Commercial nystatin suspension is not bioavailable due to poor solubility and permeability, and no *a priori* evidence suggested that nanosizing nystatin would result in systemic absorption. Indeed, nanosizing is only used to improve the bioavailability of poorly soluble but permeable drugs. Nevertheless, a pharmacokinetic study was performed because systemic absorption of nystatin in its nanosized formulation, if present, could lead to renal toxicity. No detectable absorption was found after oral administration of a single massive dose of 300 000 IU/kg. By comparison, a dose of 80 000 IU/kg was used during the *in vivo* efficacy study.

In conclusion, nanosizing provides a promising approach to increasing the efficacy of topically administered nystatin in the treatment of OPC. This novel application of nanomilling could lead to the development of improved formulations of other antimicrobial agents.

Acknowledgements

We thank undergraduate students Arwa El-Housseini, Kevin Plourde and Isabelle St-Jean for their contributions to this project. We also gratefully acknowledge the expertise of the histology core facility of the Institute for Research in Immunology and Cancer, and of Miguel Chagnon with the statistical analysis.

Funding

This work was supported by a grant from the Université de Montréal to G. L., and by a grant from the Canadian Institutes of Health Research (MOP-97734) to M. R.

Transparency declarations

None to declare.

References

- Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad Med J* 2002; **78**: 455–9.
- Gonzalez Gravina H, Gonzalez de Moran E, Zambrano O *et al.* Oral candidiasis in children and adolescents with cancer. Identification of *Candida* spp. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; **12**: E419–23.
- de Repentigny L, Lewandowski D, Jolicoeur P. Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection. *Clin Microbiol Rev* 2004; **17**: 729–59.
- Spellberg B. Novel insights into disseminated candidiasis: pathogenesis research and clinical experience converge. *PLoS Pathog* 2008; **4**: e38.
- Lopez-Martinez R. Candidosis, a new challenge. *Clin Dermatol* 2010; **28**: 178–84.
- Pappas PG. Invasive candidiasis. *Infect Dis Clin North Am* 2006; **20**: 485–506.
- Carrillo-Munoz AJ, Quindos G, Tur C *et al.* In-vitro antifungal activity of liposomal nystatin in comparison with nystatin, amphotericin B cholesteryl sulphate, liposomal amphotericin B, amphotericin B lipid complex, amphotericin B desoxycholate, fluconazole and itraconazole. *J Antimicrob Chemother* 1999; **44**: 397–401.
- Kovacic P, Cooksy A. Novel, unifying mechanism for amphotericin B and other polyene drugs: electron affinity, radicals, electron transfer, autoxidation, toxicity, and antifungal action. *Med Chem Commun* 2012; **3**: 274–80.
- Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O. It only takes one to do many jobs: amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front Microbiol* 2012; doi:10.3389/fmicb.2012.00286.
- Ratiopharm. Product Monograph (ratio-Nystatin). 2001; G50–G5.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D *et al.* Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 2009; **48**: 503–35.
- Pons V, Greenspan D, Lozada-Nur F *et al.* Oropharyngeal candidiasis in patients with AIDS: randomized comparison of fluconazole versus nystatin oral suspensions. *Clin Infect Dis* 1997; **24**: 1204–7.
- Depont F, Vargas F, Dutronc H *et al.* Drug-drug interactions with systemic antifungals in clinical practice. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 2007; **16**: 1227–33.
- Lee JW, Seibel NL, Amantea M *et al.* Safety and pharmacokinetics of fluconazole in children with neoplastic diseases. *J Pediatr* 1992; **120**: 987–93.
- Niimi M, Firth NA, Cannon RD. Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology* 2010; **98**: 15–25.
- Martinez M, Lopez-Ribot JL, Kirkpatrick WR *et al.* Heterogeneous mechanisms of azole resistance in *Candida albicans* clinical isolates from an HIV-infected patient on continuous fluconazole therapy for oropharyngeal candidosis. *J Antimicrob Chemother* 2002; **49**: 515–24.
- Kayser O, Olbrich C, Yardley V *et al.* Formulation of amphotericin B as nanosuspension for oral administration. *Int J Pharm* 2003; **254**: 73–5.

- 18** Lemke A, Kiderlen AF, Petri B *et al.* Delivery of amphotericin B nanosuspensions to the brain and determination of activity against *Balamuthia mandrillaris* amebas. *Nanomedicine* 2010; **6**: 597–603.
- 19** Italia JL, Sharp A, Carter KC *et al.* Peroral amphotericin B polymer nanoparticles lead to comparable or superior in vivo antifungal activity to that of intravenous Ambisome(R) or Fungizone. *PLoS One* 2011; **6**: e25744.
- 20** Xu N, Gu J, Zhu Y *et al.* Efficacy of intravenous amphotericin B-polybutylcyanoacrylate nanoparticles against cryptococcal meningitis in mice. *Int J Nanomedicine* 2011; **6**: 905–13.
- 21** Bin Ahmad M, Lim JJ, Shameli K *et al.* Antibacterial activity of silver bionanocomposites synthesized by chemical reduction route. *Chem Cent J* 2012; **6**: 101.
- 22** Dal Lago V, Franca de Oliveira L, de Almeida Goncalves K *et al.* Size-selective silver nanoparticles: future of biomedical devices with enhanced bactericidal properties. *J Mater Chem* 2011; **21**: 12267–73.
- 23** Morones JR, Elechiguerra JL, Camacho A *et al.* The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* 2005; **16**: 2346–53.
- 24** Flynn PM, Cunningham CK, Kerkering T *et al.* Oropharyngeal candidiasis in immunocompromised children: a randomized, multicenter study of orally administered fluconazole suspension versus nystatin. The Multicenter Fluconazole Study Group. *J Pediatr* 1995; **127**: 322–8.
- 25** Llabot JM, Manzo RH, Allemandi DA. Novel mucoadhesive extended release tablets for treatment of oral candidosis: ‘in vivo’ evaluation of the biopharmaceutical performance. *J Pharm Sci* 2009; **98**: 1871–6.
- 26** Llabot JM, Palma SD, Manzo RH *et al.* Design of novel antifungal mucoadhesive films. Part II. Formulation and in vitro biopharmaceutical evaluation. *Int J Pharm* 2007; **336**: 263–8.
- 27** Campos FF, Calpena Campmany AC, Delgado GR *et al.* Development and characterization of a novel nystatin-loaded nanoemulsion for the buccal treatment of candidosis: Ultrastructural effects and release studies. *J Pharm Sci* 2012; **101**: 3739–52.
- 28** Gunderson SM, Hoffman H, Ernst EJ *et al.* In vitro pharmacodynamic characteristics of nystatin including time-kill and postantifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 2887–90.
- 29** Gillum AM, Tsay EY, Kirsch DR. Isolation of the *Candida albicans* gene for orotidine-5'-phosphate decarboxylase by complementation of *S. cerevisiae* *ura3* and *E. coli* *pyrF* mutations. *Mol Gen Genet* 1984; **198**: 179–82.
- 30** Jones T, Federspiel NA, Chibana H *et al.* The diploid genome sequence of *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**: 7329–34.
- 31** Lacasse M, Fortier C, Trudel L *et al.* Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects. *J Oral Pathol Med* 1990; **19**: 136–41.
- 32** Groll AH, Mickiene D, Werner K *et al.* High-performance liquid chromatographic determination of liposomal nystatin in plasma and tissues for pharmacokinetic and tissue distribution studies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999; **735**: 51–62.
- 33** Solis NV, Filler SG. Mouse model of oropharyngeal candidiasis. *Nat Protoc* 2012; **7**: 637–42.
- 34** de Repentigny L, Lewandowski D, Aumont F *et al.* Oral mucosal cell response to *Candida albicans* in transgenic mice expressing HIV-1. *Methods Mol Biol* 2009; **470**: 359–68.
- 35** Merisko-Liversidge EM, Liversidge GG. Drug nanoparticles: formulating poorly water-soluble compounds. *Toxicol Pathol* 2008; **36**: 43–8.
- 36** Clinical and Laboratory Standards Institute. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts—Third Edition: Approved Standard M27-A3*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2008.
- 37** National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts—Second Edition: Approved Standard M44-A2*. NCCLS, Wayne, PA, USA, 2004.
- 38** Kamai Y, Kubota M, Kamai Y *et al.* New model of oropharyngeal candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 3195–7.
- 39** Matsubara VH, Silva EG, Paula CR *et al.* Treatment with probiotics in experimental oral colonization by *Candida albicans* in murine model (DBA/2). *Oral Dis* 2012; **18**: 260–4.
- 40** Ashman RB, Papadimitriou JM, Fulurija A *et al.* Role of complement C5 and T lymphocytes in pathogenesis of disseminated and mucosal candidiasis in susceptible DBA/2 mice. *Microb Pathog* 2003; **34**: 103–13.
- 41** Chakir J, Cote L, Coulombe C *et al.* Differential pattern of infection and immune response during experimental oral candidiasis in BALB/c and DBA/2 (H-2d) mice. *Oral Microbiol Immunol* 1994; **9**: 88–94.
- 42** Radovanovic I, Mullick A, Gros P. Genetic control of susceptibility to infection with *Candida albicans* in mice. *PLoS One* 2011; **6**: e18957.
- 43** de Repentigny L, Aumont F, Ripeau JS *et al.* Mucosal candidiasis in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2002; **185**: 1103–14.