

2m 11.3167.1

Université de Montréal

Étude des mécanismes immunitaires protecteurs à l'égard de la candidose
chez la souris transgénique exprimant le génome du VIH-1

par

Miriam Marquis

11510811 v.059

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en microbiologie et immunologie

Septembre, 2004

© Miriam Marquis, 2004



W

4

U58

2004

v.059

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté de études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Étude des mécanismes immunitaires protecteurs à l'égard de la candidose
chez la souris transgénique exprimant le génome du VIH-1

présenté par :

Miriam Marquis

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pierre Auger
président-rapporteur

Dr Louis de Repentigny
directeur de recherche

Dr Michel Roger
membre du jury

RÉSUMÉ

La candidose oropharyngée (COP) est une infection fongique opportuniste particulièrement fréquente chez les patients atteints d'infection au VIH. Toutefois, les altérations précises des mécanismes de défense qui prédisposent à l'infection de la muqueuse buccale par *Candida albicans* demeurent inconnues. La souris transgénique (Tg) exprimant le génome du VIH-1 a la particularité de reproduire les éléments cliniques et biologiques de la COP que l'on retrouve chez les patients atteints d'infection au VIH. De nombreuses études réalisées chez des souris immunocompétentes infectées à *C. albicans* ont démontré que l'immunité à médiation cellulaire est protectrice à l'égard de la COP, et que les macrophages et les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) empêchent la dissémination de la levure aux organes profonds. Les hypothèses proposées pour cette étude sont les suivantes : (i) Les lymphocytes T CD8+, les monocytes/macrophages, les PMNs, ou encore l'association de ces populations cellulaires préviennent la dissémination systémique de *C. albicans* chez la souris Tg ; (ii) Ces mêmes populations cellulaires effectrices réduisent la charge de *C. albicans* au niveau de la muqueuse buccale chez la souris Tg. La déplétion des PMNs, par l'injection d'Acm RB6-8C5, débutant à 21 ou à 45 jours après l'infection à *C. albicans*, n'a pas modifié la charge endobuccale, ni provoqué la dissémination de la levure aux organes profonds. L'analyse de la production de métabolites oxydatifs par les PMNs a montré que l'activité enzymatique des PMNs des souris Tg n'est pas perturbée par l'expression du transgène. Le rôle des lymphocytes T CD8+, comme mécanisme de défense contre *C. albicans* chez la souris Tg, est démontré par une augmentation des décomptes buccaux chez la souris Tg CD8 KO comparativement à la souris Tg. L'infection et le suivi de souris Tg mCD4C et Tg CD4E, deux lignées de souris chez lesquelles le transgène s'exprime seulement au niveau des lymphocytes T CD4+ et au niveau des lymphocytes T CD4+ et des cellules dendritiques, respectivement, nous ont permis de déterminer que l'expression du transgène au niveau de ces deux populations cellulaires est nécessaire et suffisante pour obtenir l'état de porteur chronique de *C. albicans* au niveau de la cavité buccale. En conclusion, cette étude nous a permis de démontrer que les PMNs ne sont pas impliqués dans la pathogenèse de la COP chez ces souris Tg, et également de démontrer pour la

toute première fois que les lymphocytes T CD8+ jouent un rôle dans la défense de l'hôte contre la COP.

MOTS CLES

Candidose des muqueuses, VIH, immunité des muqueuses, infection opportuniste, souris transgéniques.

SUMMARY

Oropharyngeal candidiasis (OPC) is a frequent opportunistic fungal infection among HIV-1 infected patients. However, the precise impairments of host defense mechanisms predisposing to oral infection by *Candida albicans* are enigmatic. Transgenic (Tg) mice expressing HIV-1 in immune cells develop an AIDS-like disease that closely mimics the clinical and pathologic features of candidal infection in human AIDS. Many studies performed using immunocompetent mice infected with *C. albicans* have shown that adaptive cellular immunity is protective towards OPC, and that macrophages and polymorphonuclear neutrophils (PMNs) prevent dissemination of the yeast to internal organs. The hypotheses for this study are : (i) CD8⁺ T lymphocytes, monocytes/macrophages, PMNs, or the association of these cell populations prevent systemic dissemination of *C. albicans* in these Tg mice; (ii) These same cell populations reduce mucosal outgrowth of *C. albicans* in these Tg mice. Depletion of PMNs by injection of RB6-8C5 mAb, starting at 21 or 45 days after oral infection with *C. albicans* did not modify the mucosal outgrowth, nor cause systemic dissemination of the yeast. Analysis of the production of oxidative compounds by PMNs showed that enzymatic activity of Tg mice PMNs is not perturbed by expression of the transgene. The role of CD8⁺ T lymphocytes as a defense mechanism against *C. albicans* in these Tg mice was demonstrated by an augmentation of oral burdens in CD8 KO Tg mice compared to Tg mice. Oral infection of mCD4C and CD4E Tg mice, in which the transgene is expressed only in CD4⁺ T lymphocytes and in CD4⁺ T lymphocytes and dendritic cells, respectively, showed that transgene expression in these two cell populations is necessary and sufficient to obtain the chronic carrier state of *C. albicans* in the oral mucosa. In conclusion, this study has allowed us to show that PMNs are not involved in the pathogenesis of OPC in these Tg mice, and also, for the first time, to demonstrate that CD8⁺ T lymphocytes are involved in host defense against OPC *in vivo*.

KEY WORDS

Mucosal candidiasis, HIV, mucosal immunity, opportunistic infection, transgenic mice.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	i
MOTS CLÉS	ii
SUMMARY AND KEY WORDS	iii
TABLE DES MATIÈRES.....	iv
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES FIGURES	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xi
REMERCIEMENTS	xiii

CHAPITRE 1 : BIOLOGIE DE <i>CANDIDA</i>	1
1.1 Description, classification et habitat naturel	1
1.2 Espèces	1
1.3 Pathogenèse des infections à <i>Candida</i>	1
1.3.1 Épidémiologie et manifestations cliniques	1
1.3.2 Facteurs de virulence de <i>C. albicans</i>	2

CHAPITRE 2 : LA CANDIDOSE DANS LE CONTEXTE DE L'INFECTION

AU VIH-1	6
2.1 Types de candidoses associées au VIH	6
2.1.1 Histologie de la cavité buccale	10
2.1.1.1 La muqueuse buccale	10
2.1.1.2 La langue	11
2.2 Réponse immunitaire de la muqueuse buccale à l'égard de l'infection par <i>C. albicans</i>	12
2.2.1 Les mécanismes de défense sécrétés	13
2.2.2 Les mécanismes de défense cellulaires résidents de la muqueuse	15
2.2.3 Les mécanismes de défense cellulaires mobilisés à la muqueuse	18
2.2.3.1 Les PMNs	19
2.2.3.2 Les monocytes/macrophages	21
2.2.3.3 Les cellules NK (<i>Natural killers</i> , tueuses naturelles)	24

2.2.3.4	Les lymphocytes T	25
2.2.3.4.1	Lymphocytes T CD4+	25
2.2.3.4.2	Lymphocytes T CD8+	27
2.2.3.4.3	Lymphocytes T $\gamma:\delta$	28
2.2.3.5	Les lymphocytes B	29
2.3	Quelques rappels sur le VIH	30
2.3.1	Classification du VIH	30
2.3.2	L'épidémie et la transmission du virus	31
2.3.3	La structure et le génome du VIH	31
2.3.4	Le cycle de multiplication du VIH	33
2.3.5	Le cours de l'infection et le développement de la maladie	34
2.4	Perturbations des mécanismes de défense de la muqueuse buccale contre	
	<i>C. albicans</i> provoquées par le VIH	36
2.4.1	Les défenses non-immunologiques	36
2.4.2	L'immunité innée	37
2.4.2.1	Les cellules épithéliales	37
2.4.2.2	Les cellules de Langerhans	38
2.4.2.3	Les cellules phagocytaires	38
2.4.3	L'immunité à médiation cellulaire	40
2.4.3.1	Les lymphocytes T CD4+	40
2.4.3.2	Les lymphocytes T CD8+	40
2.4.4	L'immunité humorale	41
CHAPITRE 3 : ÉTUDE DE LA PATHOGENÈSE DE LA COP À L'AIDE DE		
MODÈLES ANIMAUX		
		42
3.1	Les modèles animaux de candidose oropharyngée dans le cadre de	
	l'infection au VIH-1	42
3.1.1	Les modèles animaux de candidose oropharyngée	42
3.1.2	Les modèles animaux de COP dans le cadre de l'infection au VIH-1..	43
3.2	La COP chez la souris CD4C/HIV^{Mut}	45

RAISONNEMENT ET HYPOTHÈSES	47
MATÉRIEL ET MÉTHODES	48
RÉSULTATS	58
DISCUSSION	96
RÉFÉRENCES.....	106

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Unités de colonies viables dans les organes (cfu/gramme) des souris Tg CD4C/HIV^{MutA} inoculées de *C. albicans* intra-oralement, et ayant subi une déplétion des PMNs pendant 7 jours à l'aide de l'Acm RB6-8C5 débutant aux jours 20 et 45 post-inoculation 66 - 67

Tableau II : Unités de colonies viables dans les organes (cfu/gramme) des souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO, des souris Tg CD4C/HIV^{MutG}, des souris CD8 KO, ainsi que des souris non-Tg inoculées de *C. albicans* intra-oralement 80 - 81

Tableau III : Analyse des marqueurs de surface cellulaire des lymphocytes du sang périphérique et des ganglions lymphatiques cervicaux des souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO, des souris Tg CD4C/HIV^{MutG}, des souris CD8 KO, ainsi que des souris non-Tg inoculées intra-oralement avec *C. albicans* 82

Tableau IV : Unités de colonies viables dans les organes (cfu/gramme) de souris Tg infectées intra-oralement avec *C. albicans* chez lesquelles s'exprime le transgène du VIH-1 dans des populations cellulaires définies 92 - 93

Tableau V : Analyse des marqueurs de surface cellulaire des lymphocytes du sang périphérique et des ganglions lymphatiques cervicaux des souris Tg infectées intra-oralement avec *C. albicans* chez lesquelles s'exprime le transgène du VIH-1 dans des populations cellulaires définies 94

Tableau VI : Analyse des marqueurs de surface cellulaire des macrophages de la rate et de la muqueuse buccale de souris non-Tg ayant reçu des liposomes contenant du clodronate (LP-CL) par la voie intraveineuse et par la voie intra-jugale 95

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Exemple de candidose pseudomembraneuse	7
Figure 2 : Exemple de candidose érythémateuse	8
Figure 3 : Exemple de perlèche	9
Figure 4 : Exemple de candidose hyperplasique chronique	9
Figure 5 : Les trois systèmes de défense immunologique de la muqueuse buccale	13
Figure 6 : Les gènes du VIH-1	32
Figure 7 : Le cycle de multiplication du VIH	34
Figure 8 : Infection naturelle du VIH et progression vers le SIDA	36
Figure 9 : Structure des transgènes CD4C/HIV ^{Mut}	46
Figure 10 : Réaction chimique de la conversion du substrat non fluorescent DCFH-DA en un composé (DCF) hautement fluorescent par l'action des enzymes intracellulaires des PMNs	54
Figure 11 : Analyse immunohistochimique de la muqueuse buccale de la souris Tg CD4C/HIV ^{MutA} infectée avec <i>C. albicans</i>	60
Figure 12 : Décomptes buccaux de <i>C. albicans</i> retrouvés chez la souris Tg traitée avec un isotype IgG (ligne bleue), et chez les souris Tg CD4C/HIV ^{MutA} (ligne rouge) et non-Tg (lignes vertes) traitées avec l'Acm RB6-8C5 (A et B). À partir du jour 20 (B), chaque groupe de souris a subit son traitement respectif tous les 2 jours jusqu'au jour du sacrifice (jour 27). Les résultats représentent la moyenne des cfu ± l'écart type calculé pour chaque groupe de souris	62

Figure 13 : Nombre absolu de PMNs retrouvés dans la circulation sanguine des souris Tg et non-Tg ayant reçu l'Acm du jour 20 au jour 27 post-inoculation de *C. albicans*. Vingt-quatre heures après le début du traitement (jour 21), plus de 92% des PMNs circulants ont été déplétés et cette neutropénie fut maintenue pour une période de 7 jours 63

Figure 14 : Décomptes buccaux de *C. albicans* retrouvés chez la souris Tg traitée avec un isotype IgG (ligne bleue), et chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutA} (ligne rouge) et non-Tg (lignes vertes) traitées avec l'Acm RB6-8C5 (A, B et C). À partir du jour 45 (C), chaque groupe de souris a subit son traitement respectif à tous les 2 jours jusqu'au jour du sacrifice (jour 52). Les résultats représentent la moyenne des cfu \pm l'écart type calculé pour chaque groupe de souris 63 - 64

Figure 15 : Nombre absolu de PMNs retrouvés dans la circulation sanguine des souris Tg et non-Tg ayant reçu l'Acm du jour 45 au jour 52 post-inoculation de *C. albicans*. Vingt-quatre heures après le début du traitement (jour 46), plus de 90% des PMNs circulants ont été déplétés chez ces souris et cette neutropénie fut maintenue pour une période de 7 jours 65

Figure 16 : Mesures de la flambée oxydative (moyenne \pm écart type) des PMNs isolés des souris non-Tg et Tg infectées par *C. albicans*, ainsi que des souris non-Tg et Tg non-infectées, et ce à 7 jours (A) et à 70 jours (B) post-infection 69

Figure 17 : Dénombrement des leucocytes du sang périphérique des souris Tg non-infectées (rouge) et infectées (bleu), ainsi que des souris non-Tg non-infectées (jaune) et infectées (vert). Les prélèvements sanguins ont été effectués à 7 jours (A), 45 jours (B) et 70 jours (C) post-infection avec *C. albicans*. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart type de chaque population leucocytaire 72 - 73

Figure 18 : Décomptes buccaux de *C. albicans* retrouvés lors de la première expérience chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO (ligne rouge), chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutG} (ligne bleue), chez les souris CD8 KO (ligne verte), ainsi que chez les

souris non-Tg (ligne orange) (A, B, C, D et E). Les résultats représentent la moyenne des CFU \pm l'écart type calculé par groupe de souris 77 à 79

Figure 19 : Décomptes buccaux de *C. albicans* recueillis lors de la deuxième expérience chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO (ligne rouge), chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO hétérozygotes (ligne bleue), ainsi que chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutG} (ligne verte) (A, B et C). Les résultats représentent la moyenne des CFU \pm l'écart type calculé par groupe de souris 84 - 85

Figure 20 : Décomptes buccaux chez quatre souris Tg mCD4C/HIV^{MutG} (lignes en couleur) et chez deux souris non-Tg (lignes noires) inoculées intra oralement de *C. albicans*. Les résultats représentent les CFU calculés pour chaque souris, et ce jusqu'à 292 jours 87

Figure 21 : Décomptes buccaux chez six souris Tg CD4E/HIV^{MutG} (lignes en couleur) et chez six souris non-Tg (lignes noires) inoculées intra oralement avec *C. albicans*. Les résultats représentent les CFU calculés pour chaque souris, et ce jusqu'à 189 jours 89

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Acm : anticorps monoclonal

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

C. albicans : *Candida albicans*

Cellule NK : cellule tueuse naturelle

Cfu : unités de colonies viables

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

CTL : lymphocyte T cytotoxique

DC : cellule dendritique

EGF : facteur de croissance épidermique

GM-CSF : facteur stimulant la formation des granulocytes et des macrophages

HAART : thérapies anti-rétrovirales hautement actives

IgA : immunoglobuline A

IgG : immunoglobuline G

KO : *knockout*

LC : cellule de Langerhans

L-Cl₂MDP : liposome contenant du dichlorométhylène diphosphate (clodronate)

L-PBS : liposome contenant du PBS

M-CSF : facteur stimulant la formation des macrophages

MAIDS : SIDA murin

NO : monoxyde d'azote

OMS : organisation mondiale de la santé

ONU : organisation des nations unies

COP : candidose oropharyngée

PDGF : facteur de croissance dérivé des plaquettes

PMNs : polymorphonucléaires neutrophiles

poly[I-C] : acide polyinosinique : polycytidylique

Saps : protéase aspartyle sécrétée : protéine

SAP : protéase aspartyle sécrétée : gène

SIDA : syndrome de l'immunodéficience acquise

sIgA : immunoglobuline A sécrétoire

TCR : récepteur des lymphocytes T

Tg : transgénique

TGF- β : facteur- β transformant la croissance

T_{H0} : lymphocyte T effecteur immature

T_{H1} : lymphocyte T inflammatoire

T_{H2} : lymphocyte T auxiliaire

TNF- α : facteur- α de nécrose de tumeurs

VII : virus de l'immunodéficience humaine

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Louis de Repentigny, mon directeur de recherche, pour la confiance qu'il m'a accordée et pour sa très grande rigueur scientifique ; Francine, pour sa patience légendaire et ses conseils judicieux ; Daniel, pour l'aide qu'il m'a apportée et pour sa complicité.

Je remercie sincèrement tous ceux et celles qui croient en moi et qui me poussent à toujours persévérer : mes parents Lise et Gaétan, ma sœur Chantale, mes meilleurs amis Claude et Bruce ; France et Sébastien.

Un merci tout particulier à mon conjoint Yanic, qui par sa générosité et sa très grande patience m'a permis, me permet, et me permettra toujours de suivre la voie que j'ai choisie et de vivre mes passions.

Ce projet a été rendu possible grâce à une subvention des Instituts de recherche en santé du Canada, et de bourses d'études provenant du Département de microbiologie et immunologie et du Fonds de recherche en mycologie médicale de l'Université de Montréal.

CHAPITRE 1 : BIOLOGIE DE *CANDIDA*

1.1 Description, classification et habitat naturel

Candida est un champignon diploïde imparfait et dimorphe (Calderone, 2002). Il est la cause la plus commune de mycoses opportunistes à travers le monde. C'est aussi un saprophyte qui colonise la peau et les membranes muqueuses de 25 à 50% des humains (Glick et al., 1999). *Candida* fait partie de la flore normale de la peau, et des muqueuses buccale, vaginale et gastrique (Matthews et al., 2002). Ce pathogène opportuniste de l'homme se retrouve également dans l'environnement (Kendrick, 2000).

1.2 Espèces

Le genre *Candida* inclut environ 154 espèces (Kendrick, 2000). Parmi celles-ci, six sont plus fréquemment isolées de patients atteints de candidose. Alors que *Candida albicans* est la première cause de la candidose (80% des infections à *Candida*), *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei*, et *Candida lusitanae* sont aussi responsables d'infections à *Candida* (Odds, 1988).

1.3 Pathogénèse des infections à *Candida*

1.3.1 Épidémiologie et manifestations cliniques

La candidose est, dans la plupart des cas, une infection d'origine endogène caractérisée par une prolifération anormale de *Candida*. Toutefois, la candidose peut occasionnellement provenir de sources exogènes (comme les cathéters ou les dispositifs prothétiques) ou encore, elle peut être transmise entre humains. Par exemple, lors de la naissance, une candidose vaginale peut occasionner une candidose orale chez le nouveau-né (Matthews et al., 2002). Les *Candida spp.* sont les 4^{ième} organismes les plus souvent isolés d'hémocultures de patients hospitalisés

aux Etats-Unis (Pappas et al., 2003). De plus, 75% des femmes présenteront au moins un épisode de vaginite à *Candida* au cours de leur vie, dont 20% deviendront récurrents (Fidel et al., 1999).

Le spectre clinique de la candidose est extrêmement diversifié. Presque tous les organes et systèmes du corps humain peuvent être affectés. La candidose peut être localisée à la surface de la peau (intertrigo, périonyxis) ou au niveau des muqueuses vaginale (vaginite), gastro-intestinale (entérite, rectite) ou encore oropharyngée (muguet) (Matthews et al., 2002). Dans d'autres circonstances, la candidose peut être profonde et disséminée. Dans ce cas, la levure s'est propagée à partir du premier lieu infecté via la circulation sanguine, et elle se dissémine à l'intérieur des organes internes (reins, foie, cerveau, etc.), ce qui entraîne fréquemment la mort de l'individu (Matthews et al., 2002). On retrouve la candidose systémique chez les patients atteints de neutropénie profonde, chez les greffés de moelle osseuse et parfois, chez les patients atteints d'infection au VIH en phase SIDA avancée (Matthews et al., 2002).

Chez l'homme, plusieurs facteurs prédisposent à la candidose. Certains d'entre eux sont des facteurs d'ordres physiologique (âge), hématologique (neutropénie, SIDA), endocrinologique (diabète), ou iatrogénique (prise d'antibiotiques ou de stéroïdes, chimiothérapie, cathéters endovasculaires ou urinaires) (Matthews et al., 2002). Normalement, la candidose résultant de facteurs non-immunologiques (diabète, obésité, prise d'antibiotiques, traitement local ou systémique aux stéroïdes, etc.) peut être maîtrisée lorsque le facteur prédisposant est contrôlé. Ce sont les candidoses greffées aux perturbations immunologiques de l'hôte qui demeurent problématiques, entre autres chez les patients infectés au VIH (Matthews et al., 2002).

1.3.2 Facteurs de virulence de *C. albicans*

Afin de devenir pathogène, *C. albicans* doit être apte à réagir aux différents signaux complexes provenant de l'environnement particulier des différentes niches anatomiques de l'hôte, et ce par l'expression de gènes spécifiques reliés à sa

virulence. L'une des contraintes devant être surmontées par *C. albicans* s'avère le pH environnemental de la niche dans laquelle il doit s'établir. Il a été démontré *in vivo* et *in vitro* que deux gènes de *C. albicans*, *PHR1* et *PHR2*, sont essentiels à la survie du champignon selon le pH environnant (Mühlschlegel et al., 1997; Saporito-Irwin et al., 1995). En effet, le gène *PHR1* est fortement exprimé à pH neutre, comme c'est le cas dans la circulation sanguine, alors que le gène *PHR2* est exprimé dans des conditions acides ($\text{pH} \leq 6$), comme à l'intérieur de la cavité vaginale. Ces deux gènes sont donc complémentaires en permettant à la levure de coloniser les différentes niches de l'hôte. La création d'un mutant homozygote nul pour le gène *PHR1* de *C. albicans* a permis de confirmer que la survie *in vivo* du champignon est grandement réduite dans un modèle de candidose systémique chez la souris. Toutefois, la survie de ce mutant est conservée dans un modèle d'infection vaginale. Une information complémentaire a pu être fournie à l'aide d'un mutant homozygote nul pour le gène *PHR2* qui a survécu dans la circulation sanguine, mais pas dans un modèle d'infection vaginale de souris (De Bernardis et al., 1998).

Plusieurs adhésines sont exprimées par *C. albicans* afin de lui permettre de se lier aux ligands situés à la surface des cellules de l'hôte. La fibronectine, la laminine, le fibrinogène et le collagène de type I et IV (Chaffin et al., 1998; Hostetter, 1994) sont toutes des protéines de la matrice extracellulaire des cellules de mammifères auxquelles la levure peut se lier et ainsi, amorcer les étapes précoces de l'infection. Ces adhésines incluent : une famille de protéines possédant des séquences ressemblant aux agglutinines (agglutinin-like sequences [ALSs]), une protéine ressemblant à une intégrine (Int1p), une protéine Mnt1p possédant une activité mannosyl-transférase de type I, et finalement, une protéine Hwplp (*signal wall protein*) servant de cible pour les transglutaminases de l'hôte et permettant ainsi la formation de liens covalents entre la levure et la surface de la cellule hôte (Calderone et al., 2001).

C. albicans produit aussi des enzymes hydrolytiques qui endommagent les tissus de l'hôte et qui lui permettent d'envahir les tissus. Ces enzymes regroupent deux principales familles : les protéases aspartyles sécrétées (Saps) et les phospholipases. L'activité de ces deux familles d'enzymes est synchronisée avec la

progression de la maladie, et ce dans les différentes niches de l'hôte. Une des phospholipases, la phospholipase B, est exprimée par au moins deux gènes (*PLB1* et *PLB2*) (Leidich et al., 1998; Sugiyama et al., 1999) et elle contribue à la pathogenèse de la candidose par la dégradation des tissus de l'hôte (Ibrahim et al., 1995; Ghannoum, 2000). Les *SAPs* sont constituées d'au moins 10 gènes connus (*SAP1* à *SAP10*). Durant l'infection, les *Saps* sont responsables de la digestion des protéines de l'hôte, de l'adhérence, de la dégradation des barrières muqueuses de l'hôte, et de l'évasion des défenses de l'hôte en dégradant les immunoglobulines (IgA) et les protéines du complément (Hube et al., 1998). Des études, réalisées à l'aide de la technique de RT-PCR, ont permis d'identifier l'expression des *SAPs* au cours de l'infection buccale par le *C. albicans* (Schaller et al., 1998). Schaller et al. (1998) ont montré, à l'aide d'un modèle de la candidose buccale faisant appel à de l'épithélium humain reconstitué, que la *SAP1* et la *SAP3* sont tout d'abord exprimées à 42 heures post-infection, suivies, 6 heures plus tard, de la *SAP6* s'accompagnant de la formation d'hyphes, et se terminant 60 heures plus tard avec l'expression de la *SAP2* et de la *SAP8*. Cette même séquence fut également observée par la même équipe de chercheurs mais cette fois, à l'aide d'échantillons cliniques de patients atteints de candidose buccale. Par la suite, une étude de l'expression des *SAPs* dans la salive de patients atteints de candidose buccale, a permis de confirmer les résultats de Schaller, tout en démontrant que la *SAP4* et la *SAP5* étaient détectées chez tous les sujets étudiés. À l'aide d'un modèle de candidose vaginale chez le rat et de différents mutants de *Candida*, De Bernardis et al. (1999) ont non seulement observé l'expression des *SAPs* à ce site, mais ils ont aussi démontré que les *SAPs* étudiées (*SAP1* à *SAP6*) et, plus particulièrement, la *SAP2*, semblaient toutes jouer un rôle dans la pathogenèse de la candidose. En effet, le mutant homozygote nul de la *SAP2* était le moins virulent dans ce modèle, comparativement aux mutants nuls des autres *SAPs* et, lorsque ce gène fut réinséré chez le mutant nul, la virulence est réapparue. Ces exemples démontrent que l'expression de chaque *SAP* dépend, entre autres, de la niche ainsi que de la progression de l'infection.

Un autre facteur présumé de la virulence de *C. albicans* est sa capacité à changer de forme morphologique en réponse aux signaux provenant de l'environnement. En effet, ce champignon existe sous trois formes réversibles *in vivo*

: la forme levure unicellulaire, les pseudohyphes et les hyphes. Malgré que la formation d'hyphes ne soit pas requise pour la pathogénicité de *C. albicans*, son habileté à se transformer en hyphes a été indiquée comme facteur de virulence lors de l'invasion des tissus superficiels de l'hôte (Sweet, 1997). Durant les étapes précoces de l'infection, la formation d'hyphes pourrait favoriser la pénétration des tissus de l'hôte. De plus, par un phénomène appelé le thigmotropisme, il semblerait que *C. albicans* soit capable de «sentir» son environnement et de pénétrer l'épithélium des muqueuses via les jonctions intercellulaires (Sweet, 1997).

Finalement, le dernier facteur de virulence identifié jusqu'à maintenant est appelé le *phenotypic switching*. De nombreux facteurs de virulence de *C. albicans*, tels que la transition hyphe-levure (Anderson et al., 1989), l'adhésion aux cellules épithéliales de l'hôte (Vargas et al., 1994) et la sécrétion de la *SAP1* et de la *SAP3* (Kvaal et al., 1999) semblent gouvernés par ce phénomène. De plus, ce dernier serait responsable de l'expression de différents gènes essentiels à la virulence tels que le gène de résistance aux antifongiques *CDR3* (Balan et al., 1997), le gène spécifique à la formation de colonies blanches *WH11* (Kvaal et al., 1997), le gène spécifique à la formation de colonies opaques *OP4* (Morrow et al., 1993), et le gène essentiel au développement de la forme hyphe *EFG1* (Sonneborn et al., 1999; Srikantha et al., 2000). Le *phenotypic switching* s'observe à l'état de prototype chez la souche WO-1 de *C. albicans*, qui a la capacité de se présenter sous forme de colonies blanches ou opaques pouvant s'interchanger à la fréquence de 10^{-4} (Soll, 1992). Malgré un rôle encore inexplicé dans la virulence de *C. albicans*, le *phenotypic switching* semble particulièrement important pour l'adaptation du champignon aux différents sites anatomiques de l'hôte.

En conclusion, il est clair que la pathogénicité du *C. albicans* est très complexe : elle ne dépend pas d'un seul trait de virulence, mais bien d'un ensemble de facteurs qui semblent étroitement régulés selon l'environnement et les besoins du champignon.

CHAPITRE 2 : LA CANDIDOSE DANS LE CONTEXTE DE L'INFECTION AU VIH-1

Les infections fongiques sont une des causes les plus communes de morbidité et de mortalité chez les patients infectés par le VIH. Parmi celles-ci, la principale est la candidose oropharyngée (COP). En effet, avant l'arrivée des thérapies anti-rétrovirales hautement actives (HAART), de 50 à 70% de ces patients développaient au moins un épisode de COP durant le cours de cette maladie (Feigal et al., 1991; Samaranayake et al., 1989). Depuis l'introduction des HAART en 1996 (incluant un inhibiteur de protéase virale), le nombre de cas de candidose oropharyngée a diminué dramatiquement (Arribas et al., 2000; Cauda et al., 1999). Malgré une diminution notable de l'incidence de la COP chez les patients recevant une thérapie HAART, cette infection opportuniste demeure fréquente chez les patients infectés au VIH habitant les régions en voie de développement, tel qu'en Afrique. De plus, la thérapie HAART se complique d'effets toxiques et de problèmes d'adhérence (Montessori et al., 2004).

2.1 Types de candidoses associées au VIH

La COP chez les patients infectés au VIH peut se présenter sous différentes formes cliniques telles que la candidose pseudomembraneuse, la candidose érythémateuse, la perlèche et la candidose hyperplasique chronique (Classification and diagnostic criteria for oral lesions in HIV infection., 1993).

La candidose pseudomembraneuse, communément appelée muguet, est caractérisée par de multiples plaques blanchâtres qui, lorsqu'elles tombent ou sont enlevées, laissent apparaître une surface érythémateuse sous-jacente. Les sites les plus fréquemment impliqués sont les muqueuses buccale, labiale et du palais, ainsi que les bordures latérales et la surface dorsale de la langue. Les patients atteints du SIDA peuvent présenter des plaques blanchâtres couvrant une grande surface de la muqueuse buccale. Ces patients se plaignent souvent de sensations de brûlure et

d'altération du goût. L'inconfort chronique associé à cette forme de candidose peut entraîner une insuffisance d'apports nutritionnels et ainsi contribuer à une importante perte de poids chez le patient infecté au VIH. Ce type de candidose peut être associé aux premières étapes de l'immunodépression, mais survient plus fréquemment chez les patients avec un nombre de lymphocytes T CD4+ inférieur à 400 cellules/mm³ de sang (Powderly et al., 1992; Sangeorzan et al., 1994).



Figure 1. Exemple de candidose pseudomembraneuse

La candidose érythémateuse se caractérise par de l'érythème marqué de la muqueuse buccale (surtout au niveau du palais) et une perte de papilles sur la langue. Cette variété de candidose est observée chez les patients suivant un traitement prolongé aux antibiotiques ainsi que chez les patients atteints du SIDA. Les symptômes sont moins intenses et moins dommageables que ceux de la candidose pseudomembraneuse. Les patients se plaignent surtout de sensations de brûlures.

Durant la phase chronique asymptomatique de l'infection par le VIH, les candidoses érythémateuse et pseudomembraneuse sont toutes deux d'excellents indicateurs de l'apparition d'immunodéficience progressive chez l'hôte, et ce indépendamment du nombre de lymphocytes T CD4+ circulants (Katz et al., 1992;

Nielsen et al., 1994). Toutefois, la candidose pseudomembraneuse prédomine lorsque le nombre de lymphocytes T CD4+ chute en deçà de $200/\text{mm}^3$, alors que la candidose érythémateuse n'est pas, jusqu'à maintenant, associée de façon significative avec la progression de la maladie (Patton, 2000).



Figure 2. Exemple de candidose érythémateuse

La perlèche représente une troisième forme de COP observée chez les patients infectés au VIH. C'est une infection de la commissure des lèvres avec ou sans formation de fissures et de croûtes humides. La perlèche peut survenir de façon isolée ou en présence des deux autres formes de candidose mentionnées ci-haut. Ce type d'infection à *Candida* se développe au stade précoce de l'infection au VIH, ou en présence de xérostomie (état de sécheresse de la cavité buccale liée à une importante diminution ou à une disparition de la sécrétion salivaire résultant d'une atteinte de la totalité des glandes salivaires principales et accessoires).

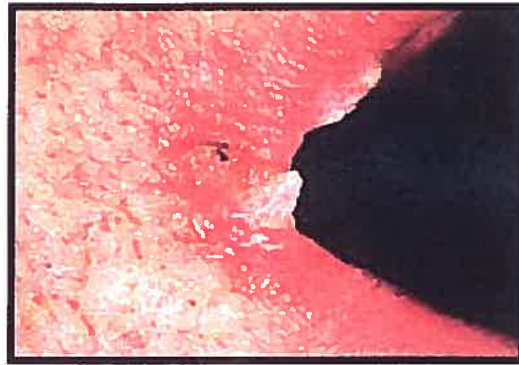


Figure 3. Exemple de perlèche

Finalement, le dernier type de COP est la candidose hyperplasique chronique aussi connue sous le nom de leucoplasie à *Candida*. Ce type de candidose est caractérisé cliniquement par des plaques confluentes blanchâtres ou jaunâtres qui ne se détachent pas en frottant, situées surtout au niveau de la muqueuse buccale derrière les commissures labiales et sur les surfaces latérales et dorsales de la langue. Les patients atteints de cette variété de candidose se plaignent fréquemment de sensations de brûlures. Outre les patients infectés par le VIH, cette forme de candidose est fréquemment retrouvée chez les fumeurs.



Figure 4. Exemple de candidose hyperplasique chronique

Chez les patients infectés au VIH, la candidose oropharyngée se complique fréquemment d'une candidose œsophagienne (Fazio et al., 1983; Levine et al., 1985). Tout comme pour la COP, c'est *C. albicans* qui est responsable de la vaste majorité des cas de candidose œsophagienne, (Bhatia et al., 1989; Bonacini et al., 1991) alors que d'autres espèces de *Candida* sont identifiées beaucoup moins fréquemment. L'œsophagite à *Candida* est habituellement (75% des cas), mais pas toujours, associée à la COP survenant de façon simultanée (Porro et al., 1989). Les patients atteints vont présenter les symptômes suivants : la dysphagie (difficulté à déglutir), l'odynophagie (douleur à la déglutition), des douleurs thoraciques sous-sternales qui ne sont pas clairement reliées à la déglutition, et/ou une impression d'obstruction abdominale. Toutefois, de 30 à 43% des patients infectés par le VIH sont asymptomatiques lors de la candidose œsophagienne. Cette forme de candidose survient habituellement lorsque le nombre de lymphocytes T CD4+ circulants est inférieur à 100/mm³ (Imam et al., 1990), bien qu'elle puisse aussi être observée durant l'immunodépression associée à la primo-infection. (Cilla et al., 1988). La candidose œsophagienne peut aussi être retrouvée chez les nouveaux-nés, les personnes âgées et les patients atteints de néoplasies. Tout comme pour la COP, l'utilisation des HAART a également entraîné une décroissance importante de l'incidence de la candidose œsophagienne et ce, comparativement à l'époque précédant l'apparition des HAART où l'incidence de ce type de candidose était de 15 à 20% (Detels et al., 2001; et Ives et al., 2001).

2.1.1 Histologie de la cavité buccale

2.1.1.1 La muqueuse buccale

La muqueuse buccale est principalement constituée d'un épithélium pavimenteux stratifié non-kératinisé qui repose sur une lamina propria constituée de tissu conjonctif lâche (Provenza, 1988). L'épithélium pavimenteux stratifié couvre 60% de la surface interne de la cavité buccale (les joues, sous la langue, le plancher de la bouche et le palais mou) de même que le pharynx (Marieb, 1999). À cause de l'abrasion causée par la mastication, l'épithélium qui recouvre les gencives et le palais dur est kératinisé ou para kératinisé (Provenza, 1988). L'épithélium kératinisé

est composé de quatre couches : *stratum basale*, *stratum spinosum*, *stratum granulosum* et *stratum corneum*. L'épithélium de la muqueuse buccale est innervé et avascularisé, tandis que la lamina propria est parcourue de capillaires qui nourrissent l'épithélium (Marieb, 1999). La lamina propria possède aussi des follicules lymphoïdes épars infiltrés par des lymphocytes, faisant parti des formations lymphoïdes associées aux muqueuses (MALT) et jouant un rôle important dans la défense de l'hôte contre les infections buccales (Marieb, 1999). En effet, la muqueuse buccale représente la première barrière de défense contre les bactéries et autres agents pathogènes qui ont libre accès au tube digestif.

2.1.1.2 La langue

La langue est une masse de muscles striés recouverts par une membrane muqueuse. Cette muqueuse est fortement attachée au muscle par la lamina propria, qui pénètre entre des amas de fibres musculaires (Marieb, 1999). Il y a peu ou pas de sous-muqueuse. Le muscle est disposé en amas de plusieurs grosseurs qui sont séparés par du tissu conjonctif s'entrecroisant à trois niveaux (Marieb, 1999). Ceci confère à la langue la flexibilité requise pour parler, positionner la nourriture, malaxer et amorcer la déglutition. Les surfaces dorsale et ventrale de la langue diffèrent quant à la nature de la muqueuse. La face ventrale est composée d'un épithélium pavimenteux stratifié non-kératinisé reposant sur une lamina propria, alors que l'épithélium couvrant la surface dorsale est kératinisé (Provenza, 1988). Un repli de la muqueuse appelé le frein lingual relie la langue au plancher de la bouche et limite son mouvement vers l'arrière (Marieb, 1999). À l'arrière, l'épithélium s'invagine afin de former les cryptes des amygdales linguales. Les cryptes amygdaliennes, qui sont situées dans la lamina propria, abritent un tissu lymphoïde nécessaire à la destruction des microorganismes pathogènes (Marieb, 1999). La langue possède une multitude de projections papillaires située aux 2/3 de la surface dorsale antérieure, provenant de la muqueuse sous-jacente. Il y a trois types de papilles retrouvées chez l'homme (et chez la souris):

1. Les papilles filiformes sont les plus petites et les plus nombreuses et sont alignées en rangées parallèles à la surface dorsale de la langue. Elles sont minces, avec des projections coniques qui n'ont pas de calicules gustatifs. Elles contiennent de la kératine, ce qui les rend plus rigides et qui donne à la langue sa teinte blanchâtre (Marieb, 1999).
2. Les papilles fungiformes (en forme de champignon) sont dispersées entre les papilles filiformes à la surface de la langue. Chacune d'entre elles possède un calicule gustatif à sa surface externe et comporte un centre vasculaire qui lui donne une teinte rougeâtre (Marieb, 1999).
4. Les papilles circumvallées ou papilles caliciformes, sont les plus grosses et les moins nombreuses. Elles sont formées de 10 à 12 papilles alignées en forme de V situées à l'arrière de la langue et positionnées devant les amygdales linguales. Chacune est entourée d'un anneau composé de muqueuse, celle-ci étant séparée par un sillon circulaire du calicule gustatif central (Marieb, 1999).

L'histologie de la muqueuse buccale est comparable chez l'homme et la souris, à l'exception d'une épaisseur réduite de 3 à 5 fois chez la souris. (Hill et al., 1981).

2.2 Réponse immunitaire de la muqueuse buccale à l'égard de l'infection par *C. albicans*

L'immunité de la muqueuse buccale peut se décrire comme étant une superposition de trois systèmes de défenses, s'étant développés au cours de l'évolution, et coopérant les uns avec les autres afin de prévenir les infections par les pathogènes endogènes et exogènes. En plus de ces trois systèmes de défense immunologique, la muqueuse buccale est aussi protégée par les différents microbes commensaux qui habitent la flore buccale. Par exemple, *Streptococcus sanguis* ainsi que d'autres streptocoques oraux compétitionnent avec *C. albicans* pour la biotine, l'une des vitamines essentielles à la survie de ce champignon (Prescott et al., 1993). Ces trois systèmes, qui sont aussi impliqués dans la lutte contre la COP, sont présentés ici.

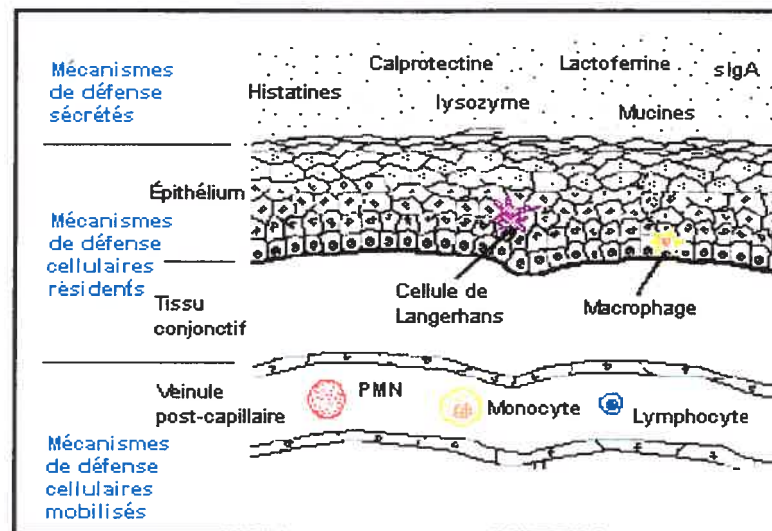


Figure 5. Les trois systèmes de défense immunologique de la muqueuse buccale

2.2.1 Les mécanismes de défense sécrétés

Certains composants de la salive, incluant la mucine et divers facteurs antimicrobiens, contribuent à la défense externe de l'épithélium buccal. Les mucines sont des glycoprotéines sécrétées par les glandes salivaires, qui sont impliquées dans la formation de biofilms ainsi que dans la lubrification de la muqueuse buccale afin de la protéger des attaques chimiques et physiques (Tabak, 1995). Edgerton et al. (1993) ont démontré que *C. albicans* peut se lier aux mucines de la salive. Un des rôles suggérés des mucines serait de limiter la prolifération de *C. albicans* au niveau de la muqueuse buccale. En effet, le débit salivaire pourrait contribuer chez le sujet normal à prévenir toute excroissance de *C. albicans* en éliminant tout surplus de la levure par la déglutition.

Les glandes parotides produisent de nombreux facteurs antimicrobiens non-spécifiques, incluant le lysozyme, la lactoferrine, les histatines, la calprotectine, et également les anticorps sécrétoires IgA spécifiques (sIgA). Comme ces derniers appartiennent à l'immunité humorale, ils seront abordés à la section 2.2.3.

Le lysozyme est une protéine cationique communément retrouvée dans la salive et dans les granules des cellules phagocytaires. Cette protéine est surtout connue pour son activité enzymatique qui lui permet de cliver les liens indispensables à l'intégrité de la paroi cellulaire microbienne. Le lysozyme est aussi capable de tuer les microorganismes qui n'ont pas de peptidoglycane, tel que *C. albicans* (Samaranayake et al., 2001b).

La lactoferrine est une glycoprotéine liant le fer et elle est produite par les cellules myéloïdes, tels les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) (et non pas par les macrophages) ainsi que par l'épithélium glandulaire. La lactoferrine empêche la croissance des microorganismes en séquestrant le fer nécessaire à leur prolifération. La lactoferrine contribue à la diminution de l'activité et de la concentration des Saps produites par *C. albicans* (Wu et al., 1999). De plus, il a été démontré que la lactoferrine exerce d'autres activités antifongiques à l'égard de *C. albicans* telles que l'endommagement de la paroi cellulaire du champignon (Nikawa et al., 1993), ainsi que l'activation d'enzymes induisant l'autolyse, contenues à l'intérieur de la levure (Laible et al., 1985).

Les histatines forment une famille de peptides basiques riches en histidine. Ces protéines sont principalement retrouvées dans les sécrétions sous-mandibulaires et parotidiennes et elles sont produites par les glandes salivaires de l'épithélium (Troxler et al., 1990). Lal et al. (1992) ont démontré que les histatines de la salive exercent un puissant effet antifongique à l'égard de *C. albicans* et ce, en réduisant la viabilité ainsi que la formation d'hyphes et de blastoconidies chez ce champignon.

Finalement, la calprotectine est le dernier facteur non-spécifique qui a été identifié comme moyen de défense contre *C. albicans*. La calprotectine est une protéine anionique retrouvée en abondance dans le cytosol de certaines cellules myéloïdes (PMNs et monocytes/macrophages), ainsi qu'à l'intérieur des cellules épithéliales (Brandtzaeg et al., 1987; Van Heyningen et al., 1990). La calprotectine est formée de deux sous unités appelées MRP8 et MRP14 agissant de concert afin de lier le calcium et le zinc, et ainsi priver les microorganismes, tel que *C. albicans*, de ces nutriments essentiels. Elle est aussi retrouvée en grande quantité dans la salive et

elle semble être impliquée dans le transport des acides gras (Siegenthaler et al., 1997).

Il existe aussi d'autres facteurs non-spécifiques contribuant à la défense de la muqueuse buccale (la peroxydase salivaire, les cystatines, la stathérine, etc.), mais jusqu'à maintenant, aucune étude ne démontre leur implication dans la défense à l'égard de *C. albicans*.

2.2.2 Les mécanismes de défense cellulaires résidents de la muqueuse

Ce système inclut l'ensemble des populations cellulaires impliquées dans la défense de la muqueuse buccale, et il a deux fonctions principales : (i) ralentir les attaques microbiennes invasives et (ii) recruter les populations cellulaires immunitaires effectrices vers la muqueuse, pour que celles-ci interviennent à leur tour contre le microorganisme pathogène.

L'épithélium sert en tout premier lieu de barrière physique en empêchant les microorganismes, tel que *C. albicans* (Squier, 1991), de pénétrer les tissus tout en réduisant leur nombre par le mécanisme de desquamation. Ce dernier phénomène est possible grâce à une prolifération et une différenciation rapide des cellules de l'épithélium buccal (*turnover*). Le temps moyen requis pour le remplacement des cellules de la muqueuse buccale est de 14 jours (Karam, 1999). La prolifération des cellules épithéliales dépend de deux principaux facteurs multifonctionnels : le facteur de croissance épidermique (EGF) et le facteur- α de nécrose de tumeurs (TNF- α) (Squier et al., 2001). La transduction des signaux de prolifération est médiée par le récepteur EGF/TNF- α qui est exprimé principalement par les kératinocytes situés au niveau basal de l'épithélium, et dont l'expression diminue à travers le *stratum corneum*. En plus d'être produit par les macrophages, le TNF- α est produit par les kératinocytes et il peut ainsi agir de façon autocrine (Krueger et al., 1990). La prolifération des kératinocytes peut être aussi stimulée en réponse à l'inflammation. Dans ce cas, il y aura production immédiate à partir des plaquettes, de facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF) et de facteur- β transformant la croissance

(TGF- β) (Abbas et al., 2000). Le TGF- β , aussi produit par les kératinocytes, augmente la prolifération du tissu conjonctif, tandis qu'il empêche la croissance de l'épithélium. Tout comme l'EGF et le TNF- α , le PDGF peut stimuler la prolifération des kératinocytes et du tissu conjonctif (Squier et al., 2001). Dans les situations où l'inflammation perdure, ces cytokines (le TGF- β , le TNF- α et le PDGF) peuvent être produites par les cellules de la lignée des monocytes/macrophages (Abbas et al., 2000). D'autres cytokines, telles que l'IL-1, l'IL-3, l'IL-6 et le GM-CSF, sont aussi produites par les cellules immunitaires et peuvent également réguler la prolifération des cellules épithéliales (Squier et al., 2001).

Les kératinocytes de la muqueuse buccale produisent également des substances antimicrobiennes telles que les β -défensines 1-3, les cathélicidines, et comme mentionné plus haut, la calprotectine. Les β -défensines et les cathélicidines sont aussi produites par les cellules épithéliales des voies respiratoires, de la muqueuse gastrique et de la peau (Harder et al., 1997; Murakami et al., 2004). Les β -défensines (Harder et al., 2001) et les cathélicidines (Frohman et al., 1997) sont peu présentes dans la salive. Toutefois, leur production augmente fortement en réponse aux microorganismes et aux stimuli inflammatoires tels que le TNF- α et l'IL-1 β . De plus, les cathélicidines sont retrouvées en abondance à l'intérieur des granules des PMNs et des macrophages (Agerberth et al., 2000; Tomasinsig et al., 2002). Le rôle antimicrobien des β -défensines (Singh et al., 1998) et des cathélicidines (Guthmiller et al., 2001) a été démontré chez les bactéries Gram-négatives et les levures telles que *C. krusei* et *C. albicans in vitro*. Ces molécules semblent donc agir comme une première barrière de défense pour prévenir la prolifération et l'invasion microbienne. Les β -défensines et les cathélicidines possèdent toutes deux une activité chimiotactique impliquant des récepteurs spécifiques tels que, respectivement, le CCR6 et le *formyl peptide receptor-like-1* (Yang et al., 1999). De plus, les cathélicidines semblent stimuler les kératinocytes à produire de l'IL-8 *in vitro* (Murakami et al., 2004).

Il a été démontré que la calprotectine inhibe la croissance, le métabolisme du glucose et la formation de tubes germinatifs chez *C. albicans in vitro* (Murthy et al., 1993; Santhanagopalan et al., 1995; Sohnle et al., 1996). Kleinegger et al. (2001) ont

observé, chez des patients atteints de candidose buccale, que les niveaux de calprotectine salivaire étaient plus élevés comparativement aux témoins non atteints. De plus, ils ont démontré que la concentration de la calprotectine, dans la salive des patients infectés à *Candida*, corrélait positivement avec l'ampleur de l'infection.

De plus, les kératinocytes jouent un rôle important dans le recrutement des cellules immunitaires lors de l'inflammation. En présence d'un pathogène, d'IFN- γ et de TNF- α , les kératinocytes expriment certaines molécules telles que : (i) les molécules du CMH de classe I, (ii) l'ICAM-1 (CD54), qui lie la molécule LFA-1 (CD11a) et qui permet ainsi la formation d'une association stable entre les cellules lymphoïdes et myéloïdes et entre les éléments tissulaires immobiles, et (iii) l'IL-8, une chémokine responsable du recrutement des PMNs ainsi que de plusieurs autres cellules myéloïdes aux tissus (Ansel et al., 1990; Eckmann et al., 1993; Huang et al., 1996; Djeu et al., 1990). De nombreux travaux ont démontré que l'IL-8 est produit par les cellules épithéliales lors de l'interaction avec *C. albicans* (Steele et al., 2002; Dongari-Bagtzoglou et al., 2003). De plus, les kératinocytes produisent la chémokine MIP-3 α qui entraîne la migration des lymphocytes T mémoires au site d'infection en réponse à l'inflammation de l'épithélium (Schmuth et al., 2002). De plus, il a été proposé que cette molécule pourrait attirer sélectivement les précurseurs des cellules de Langerhans (LC) aux tissus enflammés (Dieu-Nosjean et al., 2000).

Les LC sont ancrées dans la couche supra-basale de l'épithélium pavimenteux stratifié. Elles représentent environ 4% de toutes les cellules de l'épiderme chez l'homme (Katz, Nature, 1979) et ne sont considérées matures qu'après avoir été en contact avec l'antigène (Girolomoni et al., 2002). Les LC originent de précurseurs hématopoïétiques CD34+ de la moelle osseuse et appartiennent à la lignée myéloïde (Romani et al., 2003). Les LC ont l'apparence de cellules dendritiques (DC), car elles possèdent des projections cytoplasmiques qui vont de simples pseudopodes à de très longues dendrites (Abbas et al., 2000). Les LC ont la particularité de contenir à l'intérieur de leur cytoplasme des organelles, appelées les granules de Birbeck. Les LC expriment plusieurs antigènes de surface tels le CD1a (chez l'homme seulement, non pas chez la souris), le CD11b, CD11c, le Lag, le langerin, le CMH de classe II, le DEC-205 (récepteur de mannose impliqué dans l'endocytose), le CD4, le CD45,

le CD54 et le CD86 (Banchereau et al., 1998). De plus, tout comme les cellules de la lignée des monocytes/macrophages, les LC lient le complément et les récepteurs Fc. Les LC immatures possèdent une forte capacité de phagocytose d'antigènes aux muqueuses et vont ensuite migrer via les vaisseaux lymphatiques vers les ganglions lymphatiques régionaux (Kripke et al., 1990). Durant ce trajet, elles vont se différencier d'un phénotype actif pour la capture d'antigènes vers un phénotype de présentation d'antigène (Larsen et al., 1990). En effet, suite à la phagocytose d'un antigène, les LC vont progressivement atteindre la maturité, alors que l'expression du DEC-205 sera inhibée ; ainsi, les LC ne pourront plus internaliser d'antigènes (Romani et al., 1989). La migration et le transport d'antigènes, incluant ceux du soi, à partir de l'épithélium jusqu'aux ganglions lymphatiques est une importante fonction des LC (Romani et al., 2001). Les LC matures expriment les molécules co-stimulatrices CD40, CD54, CD58 et CD86 (Inaba et al., 1994; Ebner et al., 1998). Une fois dans les ganglions lymphatiques, les LC présentent les peptides antigéniques aux lymphocytes T naïfs et alors, ces derniers vont se différencier en cellules effectrices et sécréter des cytokines telles que l'IL-12 (qui au début de l'infection est sécrétée par les DC) et l'IL-8 qui vont permettre d'initier les réponses immunitaires acquises (Banchereau et al., 1998). Il est tout à fait probable que les LC participent à l'induction et au maintien d'une réponse immunitaire acquise contre *C. albicans*. Katou et al. (1999) ont d'ailleurs démontré que lors de l'inflammation causée par la colonisation de *C. albicans*, les LC sont mobilisées vers le derme.

2.2.3 Les mécanismes de défense cellulaires mobilisés à la muqueuse

Les différents signaux inflammatoires provenant du système de défense décrit précédemment sont responsables du recrutement et de l'activation des leucocytes impliqués dans la défense des muqueuses. Ces leucocytes incluent les PMNs, la lignée des monocytes/macrophages, les cellules NK, les lymphocytes T et les lymphocytes B.

2.2.3.1 Les PMNs

Les PMNs représentent la première barrière de défense cellulaire de l'immunité innée et ils constituent environ 50 à 60% du total des leucocytes circulants (Coxon et al., 1999). Les PMNs proviennent d'un progéniteur myéloïde de la moelle osseuse et leur développement à cet endroit dure environ deux semaines pendant lesquelles ils vont proliférer et se différencier (Coxon et al., 1999). Ensuite, les PMNs vont être relâchés dans la circulation sanguine, en un état inactivé, pour environ 12 à 24 heures, après quoi ils devront être recrutés aux tissus, sinon ils subiront l'apoptose (Coxon et al., 1999). Les PMNs morts sont retirés de la circulation par les macrophages hépatiques et spléniques (Coxon et al., 1999).

Une fois la réponse inflammatoire initiée, les PMNs sont les premières cellules à être recrutées au site d'infection ou de blessure. Ils quitteront alors la circulation sanguine pour migrer à travers les tissus par diapédèse, où ils exerceront leurs fonctions effectrices (Springer, 1994). Les PMNs sont capables de tuer les microorganismes par deux mécanismes : ceux qui dépendent de l'oxygène et ceux qui sont indépendants de l'oxygène. Les mécanismes dépendants de l'oxygène, mieux connus sous le nom de la flambée oxydative, sont caractérisés par la production de peroxyde d'hydrogène qui réagit avec la myéloperoxydase contenue dans les granules cytoplasmiques des PMNs (Hampton et al., 1998). D'autres produits issus de la réduction de l'oxygène, contribuent aussi à l'élimination des envahisseurs tels que les anions superoxyde (O_2^-) et les radicaux hydroxyles ($\cdot OH$) (Hampton et al., 1998). Les mécanismes indépendants de l'oxygène sont contenus dans les granules du cytoplasme des PMNs et incluent le lysozyme, la calprotectine, les défensines, les cathélicidines et la lactoferrine (Boman, 1995).

Les cytokines requises pour la régulation des fonctions des PMNs sont l'IFN- γ , l'IL-1, l'IL-8, le TNF- α , le GM-CSF, le G-CSF et l'IL-6 (Cassatella, 1999). Les PMNs secrètent de l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-10, l'IL-12, le TNF- α , le GM-CSF et la MIP-1 (protéine inflammatoire du macrophage) (Cassatella, 1999). Ces cytokines peuvent agir autant de façon autocrine que paracrine. Au contraire, certaines cytokines ont pour fonction de bloquer l'activation des PMNs telles que l'IL-4 et l'IL-10, qui inhibent la production d'IL-8 et la relâche de TNF- α et d'IL-1

(Cassatella, 1999). Les PMNs expriment à leur surface plusieurs molécules telles que le CD11a, le CD11b, le CD18 et les récepteurs FcR (Cassatella, 1999). Après avoir été activés, les PMNs vont sécréter des médiateurs lipidiques (PAF, acide arachidonique, thromboxane, leucotriènes, etc.) qui vont stimuler le recrutement et l'activation de cellules inflammatoires supplémentaires et aussi, entraîner la vasodilatation/vasoconstriction, la fièvre et la douleur (Cassatella, 1999).

En plus de jouer un rôle principal dans l'immunité innée, les PMNs sont aussi, en partie, responsables du développement de l'immunité acquise. En effet, il a été suggéré récemment que la production de défensines et autres peptides contenus dans les granules du cytoplasme attirent les monocytes, les lymphocytes T et les DC (Yamashiro et al., 2001). Les cibles principales des PMNs sont les bactéries, les champignons, les protozoaires et les cellules tumorales ou infectées par un virus (Abbas et al., 2000).

Il est connu depuis longtemps que les PMNs sont capables de tuer *C. albicans* *in vitro* et ce, entre autres, par la phagocytose et la flambée oxydative (Schaffner et al., 1986; Diamond et al., 1980). Plusieurs études, menées à l'aide de modèles animaux, ayant soit une altération quantitative ou qualitative des PMNs et en plus ayant subis une infection systémique par le *C. albicans* (Jensen et al., 1993; Ashman et al., 1991) ou encore, menées chez des patients neutropéniques (Bodey et al., 1966), ont permis d'établir que les PMNs sont essentiels afin de lutter contre la candidose systémique. Lacasse et al. (1990) ont clairement établi que lors de l'infection buccale expérimentale chez la souris, il y a un très fort recrutement de PMNs aux couches superficielles de l'épithélium de la muqueuse buccale dans les 48 heures suivant l'infection. Donc, il semble que les PMNs soient recrutés aux muqueuses afin d'exercer leurs fonctions effectrices. Jensen et al. ont montré que la déplétion des PMNs chez des souris SCID (absence de lymphocytes T et B) résulte en une dissémination de *C. albicans* aux organes profonds ainsi qu'une augmentation de l'intensité de l'infection buccale. Comme ces derniers ont observé chez la souris SCID témoin une persistance de la levure au niveau de la muqueuse buccale, mais pas de dissémination, ils ont suggéré que les PMNs pourraient jouer un rôle afin d'empêcher la dissémination de la levure dans la COP (Jensen et al., 1994). Cette hypothèse avait été déjà expliquée en 1990 par Cantorna et al. qui avaient étudié

l'infection orogastrique de souris *bg/bg nu/nu* (*beige* et *nude*: sans phagocytes fonctionnels et sans lymphocytes T) associée la dissémination de la levure aux organes profonds, tandis que seule une colonisation persistante de *C. albicans* à la muqueuse buccale a été observée chez la souris *nu/nu*. Toutefois, il est important de noter que dans cette étude, la contribution spécifique des PMNs à la résistance à l'égard de la candidose buccale est difficile à déterminer puisque la mutation *bg* affecte autant l'activité candidacide fongicide des PMNs que celle des macrophages (Jones-Carson et al., 1995; Vazquez-Torres et al., 1994). Plus récemment, Farah et al. ont (2001a) montré que la déplétion des PMNs chez la souris BALB/c (susceptible à la candidose buccale) entraîne une augmentation de la charge buccale de *C. albicans*. Romani et al. (1997) ont observé que les PMNs sont essentiels à la réponse protectrice de type T_H1 à l'égard de *Candida* par la sécrétion de cytokines immunomodulatrices. En effet, la déplétion des PMNs, tôt après l'infection par le *C. albicans*, entraîne une augmentation de production d'IL-4 et d'IL-10. Dans ce cas, une réponse T_H2 non protectrice à l'égard de *C. albicans* serait engagée. L'ensemble de ces données indique la complexité du rôle des PMNs dans la défense contre la COP. Le rôle précis des PMNs dans la candidose oropharyngée reste donc à déterminer.

2.2.3.2 Les monocytes/macrophages

Les phagocytes mononuclées, tout comme les PMNs, proviennent de cellules souches myéloïdes (Abbas et al., 2000). Lorsqu'ils quittent la moelle osseuse, ils sont formés de monocytes qui migrent vers la circulation sanguine. Les monocytes représentent de 1 à 6% des leucocytes circulants totaux (Stein et al., 1992). C'est lors du passage des monocytes à travers les tissus que ces derniers se différencient en macrophages. Les populations macrophagiques de la muqueuse buccale se situent au niveau de la lamina propria et y sont maintenues par trois mécanismes : l'influx de monocytes provenant de la circulation, la prolifération locale réduite et le *turnover* biologique (Colasante et al., 1992). La demi-vie des macrophages dans les tissus est de 3 à 8 jours (Stein et al., 1992). La distribution étendue des macrophages à travers

tout le corps humain rend ces cellules essentielles à la défense immédiate contre les microorganismes. À cause de leur participation dans l'ensemble des mécanismes immunitaires, les macrophages forment une population cellulaire assez hétérogène (Stein et al., 1992).

Lors d'une infection, les macrophages locaux reconnaissent l'intrus, le phagocytent et le dégradent en peptides. Ensuite, les macrophages vont sécréter des cytokines et présenter les peptides antigéniques sur leurs CMH de classe II aux lymphocytes T CD4+ naïfs. Les lymphocytes T CD4+ vont alors se différencier en cellules T_H1 et vont sécréter à leur tour des cytokines telles l'INF- γ , qui activera alors les macrophages à tuer les pathogènes intracellulaires (Cullell-Young et al., 2001). Après avoir été activés, les macrophages sont aptes à empêcher la réplication des parasites intracellulaires par au moins trois mécanismes : (i) le pH acide et le manque de nutriments à l'intérieur des vacuoles phagocytaires, (ii) par la production de la flambée oxydative (sans la myéloperoxydase), le monoxyde d'azote (NO), des hypochlorites et des hydrolases lysosomales, et (iii) par la production de molécules effectrices antimicrobiennes telles que les cathélicidines et le lysozyme (Stein et al., 1992; Agerberth et al., 2000). Aussi, une fois activés, les macrophages vont acquérir leurs fonctions effectrices et produire du TNF- α qui activera les PMNs, amplifiant ainsi les réponses immunitaires innées (Ashman et al., 1995).

L'INF- γ est la principale cytokine responsable de l'activation des macrophages. Plusieurs autres cytokines sont aussi importantes dans la régulation de l'activation des macrophages telles que l'IL-3, l'INF- α , INF- β , le MIP-1, le M-CSF, le GM-CSF et le TNF- α (Stein et al., 1992). Une fois activés, les macrophages vont sécréter plusieurs cytokines telles l'IL-1, l'IL-6, l'IL-8, l'IL-12, le TNF- α , le M-CSF et le GM-CSF (Stein et al., 1992). Les macrophages ont à leur surface une multitude de récepteurs comprenant, entre autres, le récepteur du lipopolysaccharide (LPS), le récepteur du mannose, le CD11a, le CD11b, le CD54, le CD64, le CD80, le CD86, et les récepteurs pour le complément (Abbas et al., 2000). De plus, tout comme les PMNs, les macrophages sont d'importants producteurs de métabolites induisant l'inflammation telle que l'acide arachidonique (Vazquez-Torres et al., 1997). Ces cellules jouent un rôle clé dans la défense de l'hôte contre les bactéries, les

protozoaires, les champignons, les helminthes ainsi que contre les tumeurs (Abbas et al., 2000).

Plusieurs études *in vitro* ont montré que les macrophages sont aussi aptes à tuer les levures que les hyphes de *C. albicans* (Vazquez-Torres et al., 1997). L'augmentation du nombre de macrophages dans la lamina propria et dans la sous-muqueuse de l'estomac des souris en réponse à la colonisation buccale de *C. albicans* suggère que ces cellules jouent un rôle clé dans la résistance à la candidose (Cole et al., 1996; Vazquez-Torres et al., 1995). Jensen et al. (1992 ; 1994) ont démontré que la diminution des fonctions macrophagiques à l'aide de l'acide polyinosinique : polycytidylique (poly[I·C]), chez des souris SCID infectées par la voie oro-gastrique entraîne, 7 jours plus tard, une dissémination de la levure aux organes profonds chez 60% des souris. Au cours de la même expérience, les témoins immunocompétents ayant reçu le traitement (poly[I·C]) avaient résisté à la candidose disséminée d'origine endogène (Jensen et al., 1994). Lors de l'altération combinée des fonctions des macrophages et des neutrophiles, Jensen et al. (1994) ont observé que de la dissémination aux organes profonds et ce, tant chez la souris SCID que chez la souris immunocompétente.

De plus, le macrophage semble être aussi impliqué dans la défense contre la candidose oro-gastrique par la production de NO. Il a été démontré que cette molécule est fongicide à l'égard de *C. albicans in vitro* (Vazquez-Torres et al., 1994; Cenci et al., 1993). Deux études réalisées chez la souris athymique et chez la souris SCID ont démontré que la production de NO par les macrophages est importante dans la résistance à la candidose orogastrique (Jones-Carson et al., 1995; Vazquez-Torres et al., 1995). Malgré tout, le mécanisme effecteur par lequel le NO contribue à la protection contre la candidose buccale demeure inconnu. Le principal obstacle à une étude plus approfondie est la difficulté à isoler ces cellules de la muqueuse buccale.

2.2.3.3 Les cellules NK (*Natural killers*, tueuses naturelles)

Les cellules NK font aussi partie de l'immunité innée et représentent de 5 à 16 % de la population totale des lymphocytes humains (Lanier et al., 1986). Ces cellules tueuses résultent de la différenciation de cellules souches lymphoïdes produites par la moelle osseuse (Lanier et al., 1986). Les NK sont des cellules dont les gènes codants pour le TCR (*T cell receptor*, récepteur des lymphocytes T) ne sont pas réarrangés donc, elles n'expriment pas de molécule CD3 (sous unité accompagnant le TCR) (Lanier et al., 1986). L'IL-12, sécrétée par les macrophages, est essentielle à l'activation des cellules NK qui, à leur tour, produisent de l'IFN- γ et du TNF- α (Biron et al., 1999). Par la production de ces cytokines, les cellules NK vont activer les macrophages, et ainsi leur permettre de tuer les pathogènes intracellulaires. Les cellules NK possèdent aussi des récepteurs KIR (*killer inhibitory receptor*) qui reconnaissent le CMH de classe I (Lanier, 1998). Ces cellules possèdent plusieurs autres récepteurs dont le CD2, le CD8, le CD11a, le CD16 (récepteur Fc γ), le CD54 et le CD56 (Lanier et al., 1986). De plus, les cellules NK contiennent dans leur cytoplasme des protéines antimicrobiennes, appelées les perforines et les granzymes, qui sont toutes deux relâchées suite au contact entre la cellule NK et la cellule cible, pouvant ainsi tuer par cytolyse les cellules infectées par les virus et les cellules tumorales (Lanier et al., 1986). De plus, ces cellules sont fongistatiques à l'égard de certains champignons tels que le *Cryptococcus neoformans in vitro* (Hidore et al., 1991; Levitz et al., 1994).

L'activité des cellules NK à l'égard de *C. albicans* demeure controversée. Certaines études ont suggéré que les cellules NK n'ont aucune activité antifongique à l'égard de *C. albicans* (Zunino et al., 1988; Arancia et al., 1995), alors que d'autres études ont suggéré que les cellules NK ont la capacité d'inhiber la croissance de ce champignon *in vitro* (Beno et al., 1990; Murphy, 1991). Des études supplémentaires seront nécessaires afin de trancher cette question.

2.2.3.4 Les lymphocytes T

Les lymphocytes T proviennent tous d'un progéniteur lymphoïde commun de la moelle osseuse. Ces cellules sont particulières, car elles doivent absolument migrer par le thymus afin de se différencier (von Boehmer, 1993). En effet, c'est dans cet organe que les cellules T subiront les sélections qui vont permettre de générer les différentes classes fonctionnelles de lymphocytes T, tels que les T CD4+, les T CD8+ et les cellules T $\gamma:\delta$ (von Boehmer, 1993). Ces dernières ont comme particularité, dans la majorité des cas, de ne pas exprimer de corécepteur (ni CD4, ni CD8). Jusqu'à maintenant, peu est connu des mécanismes de la sélection thymique des lymphocytes T $\gamma:\delta$ (Haas et al., 1992). Une fois qu'ils ont terminé leur différenciation thymique, les lymphocytes T entreront dans la circulation et migreront vers les organes lymphoïdes périphériques et ce, jusqu'à ce qu'ils rencontrent un antigène (von Boehmer, 1993).

2.2.3.4.1 Lymphocytes T CD4+

Tel que mentionné plus haut, ce sont les macrophages et les cellules dendritiques qui suite à la phagocytose ont le rôle de présenter les antigènes aux lymphocytes T naïfs (Knight et al., 1993). C'est par l'interaction entre le complexe du CMH de classe II - peptide antigénique et le complexe TCR $\alpha\beta$: CD3 assisté du co-récepteur CD4, le tout combiné à l'interaction entre les récepteurs CD80 et CD28 (respectivement présents sur la cellule présentatrice d'antigène et sur le lymphocyte T naïf), que la cellule T naïve va s'activer (Linsley et al., 1993). Alors, cette dernière va sécréter de l'IL-2 qui agira de façon autocrine afin d'induire la prolifération et la différenciation du plus grand nombre de lymphocytes T effecteurs immatures (T_{H0}) possible (Linsley et al., 1993). Par la suite, selon l'antigène et les cytokines produites, il y aura une sélection des cellules T_{H0} en cellules T inflammatoires (T_{H1}) ou en cellules T auxiliaires (T_{H2}). Ce sont principalement les bactéries et parasites intracellulaires, accompagnés de cytokines telles que l'IL-12 et l'IFN- γ , qui génèrent la voie T_{H1} (Linsley et al., 1993). La voie T_{H2} est engagée par les autres formes de pathogènes et par l'IL-4

(Linsley et al., 1993). C'est ici que le rôle de pivot central du lymphocyte T dans l'immunité acquise prend tout son sens : l'activation sélective de cellules T_H1 conduit à l'immunité à médiation cellulaire, alors que la production sélective de cellules T_H2 alimente l'immunité humorale. Les cellules T_H1 secrètent de l'IFN- γ et du TNF- α , qui sont les principales cytokines activatrices des macrophages, ainsi que de la lymphotoxine (LT ou TNF- β) qui activera les PMNs (Linsley et al., 1993). Les cellules T_H2 secrètent de l'IL-4, de l'IL-5, de l'IL-6 et de l'IL-10, qui activeront l'immunité humorale. De plus, il est connu que l'IL-4 et l'IL-10 inhibent la voie T_H1 (Linsley et al., 1993).

Le rôle critique des lymphocytes T CD4+ dans la défense de l'hôte contre la candidose est suggéré par les épisodes fréquents d'infection chez les patients ayant des altérations de ces cellules (Duncan et al., 1993). De plus, la candidose oropharyngée se manifeste surtout chez l'humain ayant une atteinte des lymphocytes T tels que les patients infectés par le VIH et les patients atteints du syndrome de Di George. (Leigh et al., 2001; Samaranyake, 1992; Reichart et al., 2000). Plusieurs modèles d'infection expérimentale chez l'animal ont permis de confirmer cette observation. Des souris SCID, athymiques, déplétées en cellules T CD4+ ou bien *knockout* pour la chaîne alpha du TCR et ayant subies une infection buccale avec *C. albicans* ont toutes été associées à une susceptibilité accrue à l'égard de la candidose des muqueuses (Balish et al., 1984; Cantorna et al., 1991; Jensen et al., 1993). Ces résultats suggèrent entre autres que malgré le nombre et l'activité normale des phagocytes chez ces souris, l'activité anti-*Candida* dépend principalement des lymphocytes T. Aussi, il est important de noter que dans toutes ces déficiences en lymphocytes T CD4+ aucun cas de dissémination aux organes internes de *C. albicans* n'a été observé, à moins d'être associé à une déficience des phagocytes (Cantorna et al., 1990). Plusieurs expériences utilisant des modèles animaux ont permis de confirmer que la protection contre la candidose des muqueuses semble être dépendante de la production de cytokines de type T_H1 (Romani, 1999). Cenci et al. (1998) ont montré que l'INF- γ et l'IL-12, c'est-à-dire les deux plus importantes cytokines de la voie T_H1 , sont requises afin d'éliminer l'infection à *C. albicans*. De plus, un changement du profil des cytokines salivaires vers le profil T_H2 a été observée chez les patients infectés au VIH et atteints de COP (Leigh et al., 1998).

Dans l'ensemble, ces études démontrent donc l'importance primordiale des lymphocytes T CD4+ dans la résistance de l'hôte contre la COP.

2.2.3.4.2 Lymphocytes T CD8+

Contrairement aux lymphocytes T CD4+, les lymphocytes T CD8+ naïfs sortant du thymus sont déterminés à devenir des lymphocytes T cytotoxiques (CTL). Ces cellules ont pour rôle principal de détruire les cellules infectées par les virus. Les cellules infectées produisent de l'IFN- γ et β et expriment le CMH de classe I. L'IL-2, l'IFN- γ et β combinés à l'interaction entre le complexe CMH de classe I : peptide antigénique et le complexe TCR $\alpha\beta$: CD3 accompagné cette fois du co-récepteur CD8 présent sur la cellule T vont alors permettre la différenciation des lymphocytes T CD8+ naïfs en CTL (Abbas et al., 2000). Une fois activée, le CTL va exercer ses fonctions effectrices en produisant des cytotoxines induisant l'apoptose des cellules cibles, telles que la perforine et les granzymes et elle va aussi sécréter de l'IL-2, de l'INF- γ et du TNF- α (Kagi et al., 1994).

Le rôle que pourrait jouer les lymphocytes T CD8+ contre la COP reste à déterminer. Des études menées par Beno et al. (1995) ont montré que les lymphocytes T CD8+ sont fongistatiques à l'égard de *C. albicans in vitro*. Myers et al. (2003) ont proposé que les lymphocytes T CD8+ pourraient jouer un rôle protecteur dans la COP après avoir observé, par la technique d'immunohistochimie, un recrutement de ces cellules dans la muqueuse buccale de patients infectés au VIH et atteints de COP. Ces résultats concordent avec des observations antérieures démontrant la présence de lymphocytes T CD8+ dans la lamina propria de patients infectés au VIH et atteints de COP (Romagnoli et al., 1997; Williams et al., 1997). L'infiltration des lymphocytes T CD8+ a aussi été observée chez la souris DBA/2 susceptible à la candidose oropharyngée (Chakir et al., 1994). Toutefois, ces études ont démontré que les lymphocytes T CD8+ recrutés à la muqueuse buccale étaient localisés aux couches profondes de l'épithélium, et donc trop loin des hyphes de *C. albicans*, qui sont situés aux couches superficielles de l'épithélium, pour exercer un effet cytotoxique direct (Challacombe et al., 1997; Eversole et al., 1997). Nous

ignorons donc si les lymphocytes T CD8⁺ exercent un rôle protecteur à l'égard de la COP, que ce soit par cytotoxicité directe ou encore indirectement par la sécrétion de cytokines.

2.2.3.4.3 Lymphocytes T $\gamma:\delta$

Les lymphocytes T $\gamma:\delta$ diffèrent beaucoup des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dont il a été question ci-haut. Ils possèdent un TCR de phénotype $\gamma:\delta$. Ce TCR peut se lier à une grande diversité d'antigènes tels que les protéines intactes, les molécules organiques, les antigènes qui sont présentés ni par le CMH de classe I ni par le CMH de classe II, et aussi les antigènes qui ne sont pas présentés par les cellules présentatrices d'antigènes (Williams, 1998). La plupart de ces cellules n'ont ni le récepteur CD4 ni le CD8 à leur surface (Abbas et al., 2000). Une fois sorties du thymus, ces cellules migrent principalement vers les tissus épithéliaux (intestin, peau, muqueuses buccale et vaginale) et ne migrent pas entre la circulation sanguine et la circulation lymphatique. Les lymphocytes T $\gamma:\delta$ représentent moins de 5% des lymphocytes T circulants et ils sont encore plus rares dans les ganglions lymphatiques (Vroom et al., 1991). Ces cellules produisent une multitude de cytokines essentielles incluant l'IL-2, l'IL-3, l'IL-4, l'IL-5, le GM-CSF, le TNF- α et β , et l'IFN- γ (Aljurf et al., 2002). Des études cliniques ont permis d'observer chez des patients atteints de différents types de maladies infectieuses telles que la lèpre, la leishmaniose et la malaria, ainsi que dans certaines maladies auto-immunes, telles que l'arthrite rhumatoïde et la maladie coeliaque, que le nombre de lymphocytes T $\gamma:\delta$ est en expansion (Modlin et al., 1989; Roussilhon et al., 1994; Holoschitz, 1989; Holm et al., 1992). De plus, ces cellules sembleraient jouer un rôle à l'égard des cancers, car elles s'accumulent préférentiellement au niveau de certaines tumeurs malignes et elles lysent les cellules tumorales *in vitro* (Duval et al., 1995; Ensslin et al., 1991).

Il existe très peu d'informations concernant le rôle protecteur potentiel des cellules T $\gamma:\delta$ dans la candidose oropharyngée. Une augmentation du nombre de ces cellules a été observé dans la muqueuse buccale de souris immunocompétentes

infectées oralement avec *C. albicans*, s'accompagnant de l'élimination définitive de la levure (Chakir et al., 1994). Par ailleurs, l'infection de souris *knockout* pour la chaîne δ du TCR $\gamma:\delta$ a mené à la colonisation persistante de la levure au niveau de la muqueuse buccale, mais pas à la dissémination aux organes profonds (Jones-Carson et al., 2000). Comme ces cellules sont peu abondantes et difficilement accessibles (presque uniquement retrouvées dans les tissus), de nouveaux travaux seront nécessaires afin d'identifier la contribution de ces cellules aux défenses de l'hôte à l'égard de *C. albicans*.

2.2.3.5 Les lymphocytes B

Les lymphocytes B proviennent d'une cellule progénitrice lymphoïde de la moelle osseuse (Kantor et al., 1993). Il est maintenant connu que ce sont principalement les lymphocytes T CD4⁺ de phénotype T_H2 qui sont responsables de l'activation des lymphocytes B, et que ces derniers jouent un rôle clé dans l'immunité humorale. Après s'être différencié en lymphocytes T CD4⁺ T_H2, ce dernier va produire des cytokines et rencontrer le lymphocytes B dans un follicule lymphoïde d'un ganglion lymphatique (Liu et al., 1992). Il y aura alors interaction entre les récepteurs CD40 et CD40L présents à la surface des lymphocytes B et des lymphocytes T CD4⁺, respectivement, et en collaboration avec l'IL-4, l'IL-5 et l'IL-6 produites par les lymphocytes T CD4⁺ de phénotype T_H2, la cellule B va s'activer, se différencier en plasmocytes, et commencer à sécréter des anticorps spécifiques à l'envahisseur à éliminer (Parker et al., 1993).

Les anticorps sIgA produits au niveau de la muqueuse buccale par les plasmocytes sont le seul composant sécrété pouvant spécifiquement cibler un microorganisme. Le corps humain produit trois fois plus d'IgA par jour que tous les autres isotypes d'immunoglobulines réunies et le 2/3 de ces IgA sont produites sous la forme de sIgA (Mestecky et al., 1986). Les sIgA salivaires reconnaissent les mannoprotéines localisées à la surface de la paroi cellulaire de *C. albicans*. L'expression de ces mannoprotéines est modulée par de nombreux facteurs, incluant la température de croissance, la composition du milieu, la transition levure-hyphes, et

le pH (Bikandi et al., 2000; Polonelli et al., 1994; Polonelli et al., 1997). Deux études ont permis de démontrer que les sIgA inhibent l'adhérence de la levure aux cellules épithéliales de la muqueuse buccale *in vitro* (Epstein et al., 1982; Vudhichamng et al., 1982). De plus, San Millán et al. (2000) ont démontré que l'inhibition de l'adhérence de *C. albicans* au polystyrène est due aux sIgA salivaires. Enfin, une augmentation des sIgA spécifiques à l'égard de *C. albicans* a été démontré chez des sujets atteints de candidose orale (Jeganathan et al., 1992; Tylenda et al., 1989). Toutefois, la COP n'est pas une maladie retrouvée chez les personnes atteintes de déficiences sélectives d'IgA. Donc, les sIgA pourraient peut-être contribuer à l'activité antimicrobienne contre *C. albicans*, mais en interaction avec d'autres mécanismes de défense des muqueuses.

2.3 Quelques rappels sur le VIH

2.3.1 Classification du VIH

Le VIH est un rétrovirus complexe appartenant à la sous-famille des *Lentivirinae* (Lentivirus) (Flint et al., 2000). Ce rétrovirus cytolitique cause le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA), une maladie dégénérative lente et progressive du système immunitaire et du système nerveux central (Flint et al., 2000). Il existe deux sous-types de VIH, le VIH-1 et le VIH-2 qui présentent des différences au niveau de l'organisation génétique, de la pathogenèse et de la propagation. Le VIH-1 fut découvert en 1981 suite au signalement de l'accroissement anormal du nombre de cas de pneumonies à *Pneumocystis carinii* et de sarcomes de Kaposi, deux affections très rares à l'époque et qui sont maintenant communément associées à cette infection virale (Flint et al., 2000). Le VIH-1 est responsable de la pandémie actuelle, tandis que le VIH-2 est prévalent exclusivement dans certaines régions de l'Afrique de l'Ouest. Le VIH-2 est beaucoup moins virulent que le VIH-1 (Flint et al., 2000). Les individus infectés au VIH-2 développent aussi le SIDA, mais avec une période de latence clinique beaucoup plus longue, et il y a moins de cas de mortalité associés à ce sous-type.

2.3.2 L'épidémie et la transmission du virus

Depuis l'émergence du SIDA en 1981, le nombre de personnes atteintes ne cesse d'augmenter. Selon les statistiques de l'OMS et de l'ONU SIDA, le nombre des personnes vivant avec le VIH/SIDA continue de croître dans plusieurs régions, et plus particulièrement en Afrique (ONUSIDA/OMS, 2003). L'Asie ainsi que l'Europe de l'est enregistrent également un nombre croissant de personnes vivant avec le VIH/SIDA. L'épidémie mondiale de VIH/SIDA a tué plus de 3 millions de personnes en 2003, dont 610 000 enfants de moins de 15 ans. La proportion de femmes infectées par le VIH ne cesse d'augmenter, et 50% des personnes atteintes mondialement sont des femmes comparativement à seulement 6% des cas totaux en 1985. En 2003, l'ONU SIDA estime que 5 millions de personnes ont acquis le VIH, ce qui porte à 40 millions le nombre de personnes vivant avec le virus dans le monde actuellement. De plus, l'ONU prédit qu'avant 2010, plus de 25 millions d'enfants auront perdu au moins un de leur parents à cause du SIDA.

La transmission du VIH suit trois voies principales : (i) la contamination néonatale (par la voie transplacentaire ou à l'accouchement par absorption de fluides contaminés) ou post natale par l'allaitement maternel, (ii) l'administration de sang ou de dérivés de sang contaminé : transfusion, partage de drogue injectable, administration de facteurs plasmatiques non-traités, et (iii) les rapports sexuels non protégés (Nathanson et al., 2001).

2.3.3 La structure et le génome du VIH

Le VIH est composé d'une enveloppe formée par l'association de deux glycoprotéines : la gp120 (responsable de la fixation au récepteur cellulaire) et la gp41 (responsable de la fusion de l'enveloppe avec la membrane cellulaire), ainsi que de protéines qui tapissent la face interne de l'enveloppe formant la matrice (Flint et al., 2000). De plus, le VIH possède une capsid qui est formée par l'assemblage de la protéine p24 et qui contient le génome viral et les enzymes nécessaires à la survie du virus (Flint et al., 2000). Le génome de ce virus est composé de 2 ARN

monocaténares de polarité positive étroitement associés à des protéines de nucléocapside qui les réunissent, les protègent de l'activité des enzymes cellulaires et interviennent dans l'assemblage des virions (Flint et al., 2000).

Le génome du VIH exprime 3 grandes catégories de protéines (figure 6): les protéines internes (la p17, la p24 et la p7 du gène *gag*), les enzymes virales requises pour la réplication virale (la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase du gène *pol*) et les glycoprotéines d'enveloppe (gp120 et gp41 du gène *env*) qui sont nécessaires afin d'initier l'infection des cellules cibles par le virus (Abbas et al., 2000). En plus, le VIH possède une série de gènes régulateurs (*tat*, *rev*, *vif*, *nef*, *vpr*, et *vpu*) qui régulent la production virale (Abbas et al., 2000). Parmi ceux-ci, *tat* est requis pour l'allongement du transcrit viral, *rev* aide à promouvoir l'exportation des ARNs viraux à partir du noyau, *vif* augmente l'infektivité des particules virales, *nef* diminue l'expression du corécepteur CD4 et du CMH de classe I et augmente la relâche du virus par la cellule hôte, *vpr* favorise l'importation nucléaire de l'ADN viral et arrête le cycle cellulaire en phase G2 et finalement, *vpu* diminue aussi l'expression du corécepteur CD4 et augmente la relâche de virus à partir de la cellule hôte (Abbas et al., 2000).

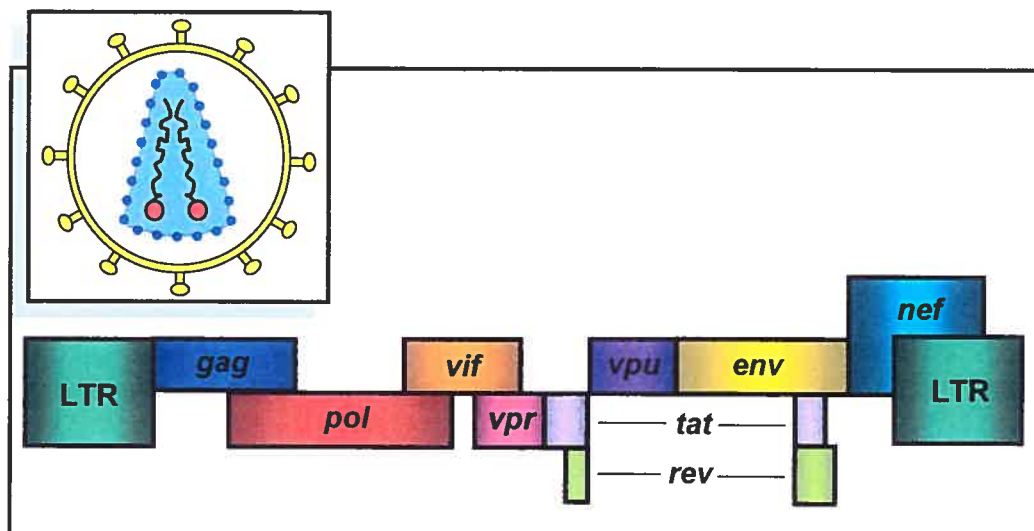


Figure 6. Les gènes du VIH-1. Inspiré de Abbas et al., 2000

2.3.4 Le cycle de multiplication du VIH

Le cycle du VIH débute lorsque sa glycoprotéine gp120 se lie au récepteur CD4 à la surface de la cellule hôte (Abbas et al., 2000) (figure 7). Cette action induira un changement de conformation de la protéine gp120 qui se liera alors à un corécepteur de chemokine présent à la surface de la cellule. Cette liaison entraînera l'exposition d'un peptide de fusion au niveau de la protéine gp41 du VIH, qui s'insèrera dans la membrane de la cellule hôte et qui permettra la fusion de l'enveloppe du virus (Abbas et al., 2000). Ensuite, le virus pénétrera dans la cellule, puis il y aura décapsidation du VIH pour laisser pénétrer le génome viral. Une fois à l'intérieur du cytoplasme, l'ARN génomique sera transcrit par la transcriptase inverse en un brin complémentaire d'ADN dit "négatif" (ADN-) (Abbas et al., 2000). Sur ce brin d'ADN- un ADN+ sera synthétisé par la cellule, dans son cytoplasme, puis l'ARN viral sera détruit par les RNases cytoplasmiques. Les ADN doubles brins d'information virale migreront à l'intérieur du noyau et se circulariseront. Quelques uns de ces ADN circulaires s'incorporeront à l'ADN de la cellule hôte (provirus) par l'action de l'intégrase (Abbas et al., 2000). L'activation ultérieure de la cellule induira un faible niveau de transcription de provirus. Les transcrits ARN seront alors épissés de diverses façons, ce qui permettra la transcription des gènes précoces *tat* et *rev*. Le gène *tat* amplifiera la transcription d'ARN viral, tandis que le gène *rev* augmentera le transport d'ARN viral après un seul épissage ou sans épissage vers le cytoplasme (Abbas et al., 2000). Les protéines tardives Gag, Pol, et Env seront traduites et assemblées en particules virales qui bourgeonneront hors de la cellule hôte pour aller infecter d'autres cellules (Abbas et al., 2000).

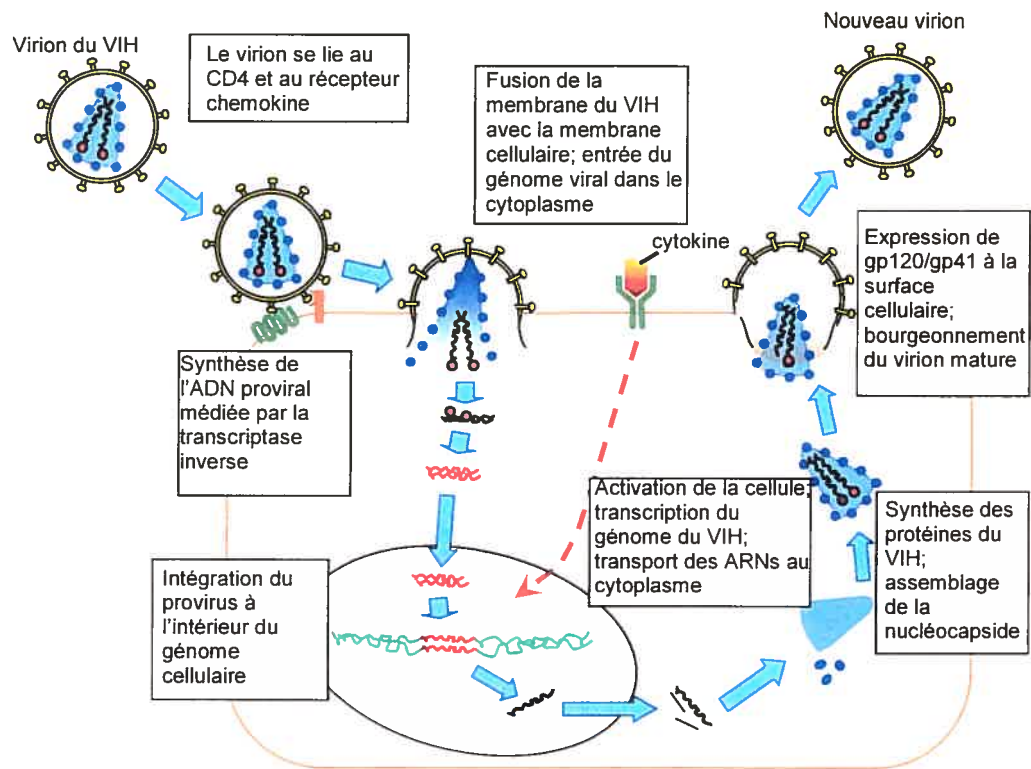


Figure 7. Le cycle de multiplication du VIH. Inspiré de Abbas et al., 2000

2.3.5 Le cours de l'infection et le développement de la maladie

La première phase peut-être symptomatique ou asymptomatique, et elle se nomme la primo-infection. Quand cette dernière est symptomatique (chez 50 % des sujets infectés), elle se manifeste par des signes et symptômes généraux peu spécifiques, tels que des adénopathies cervicales, de la fièvre, la pharyngite avec dysphagie, la fatigue, les myalgies, les courbatures, et les éruptions maculopapuleuses (Lloyd et al., 1996). Comme ces manifestations cliniques ressemblent à celle observées au cours de diverses affections virales aiguës (comme la mononucléose infectieuse), la primo-infection risque souvent de passer inaperçue. Pendant cette phase, le virus se multiplie intensément et se dissémine à l'intérieur des tissus lymphoïdes (ganglions et rate) (Abbas et al., 2000). Une chute brutale des lymphocytes T CD4⁺ survient dans le sang, ainsi qu'une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8⁺

cytotoxiques s'accompagnant d'une apparition dans le sérum d'anticorps dirigés contre l'ensemble des protéines du VIH (Abbas et al., 2000). La fin de cette phase est marquée par le retour à la normale du nombre de lymphocytes T CD4+ dans la circulation (Abbas et al., 2000).

Lors de la deuxième phase appelée la phase asymptomatique, on observe une chute de la virémie plasmatique et un pic d'anticorps (Abbas et al., 2000). Le niveau de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques est légèrement élevé durant cette période de temps (Abbas et al., 2000). Le virus se réplique continuellement dans les organes lymphoïdes, et le nombre de lymphocytes T CD4+ diminue lentement, mais inexorablement (Abbas et al., 2000). La deuxième phase est de durée très variable et peut être assez prolongée (10 à 15 ans).

La troisième phase clinique correspond au SIDA. On assiste brusquement à une résurgence active de l'infection virale ainsi que d'un effondrement du nombre de lymphocytes T CD4+ (taux inférieur à 200 par mm^3 de sang) (Abbas et al., 2000). De plus, une diminution du nombre total de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques est observée (Abbas et al., 2000). C'est pendant cette phase que l'on observe de façon plus marquée la destruction des cellules lymphoïdes et de l'architecture normale des tissus lymphoïdes (Abbas et al., 2000). Les manifestations cliniques caractéristiques du SIDA apparaissent chez le patient (néoplasies, cachexie, néphropathie liée au VIH, dégénérescence du système nerveux central) coïncidant avec l'apparition d'infections opportunistes (Grunfeld et al., 1992).

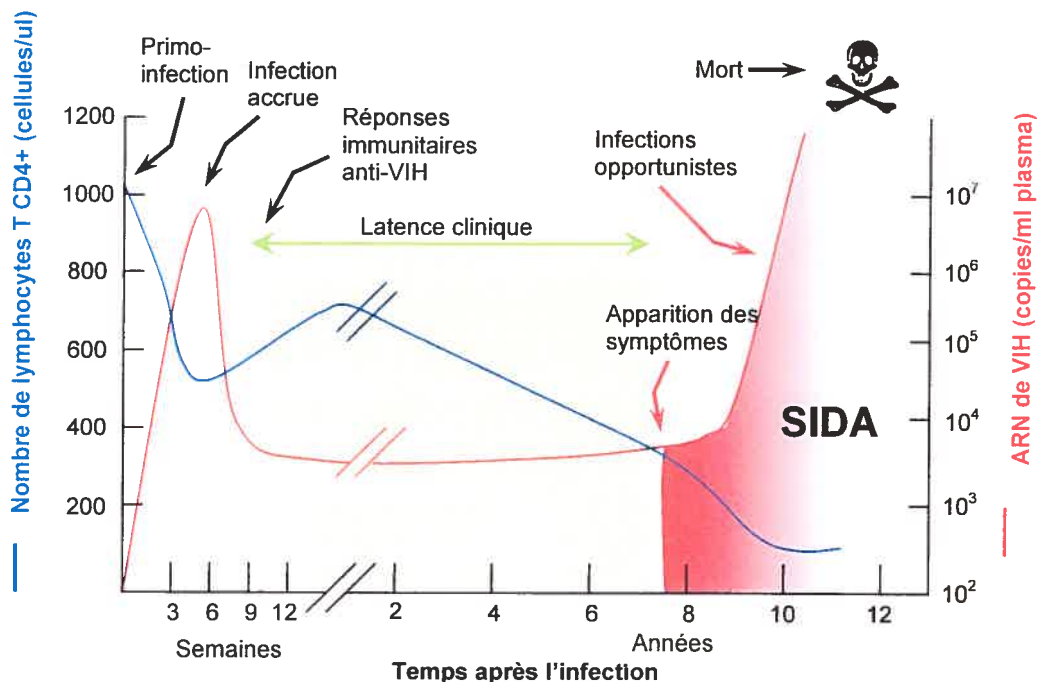


Figure 8. Infection naturelle du VIH et progression vers le SIDA. Inspiré de Flint et al., 2000

2.4 Perturbations des mécanismes de défense de la muqueuse buccale contre *C. albicans* provoquées par le VIH

2.4.1 Les défenses non-immunologiques

Jusqu'à maintenant, les études menées sur les facteurs non-immunologiques dans le cadre de la pathogenèse de la COP chez les patients infectés par le VIH s'avèrent contradictoires, en ce qui concerne la lactoferrine, le lysozyme, l'histatine et la calprotectine. Muller et al. (1992) ainsi que Lu et al. (1994) ont observé une diminution de la lactoferrine dans la salive de patients infectés par le VIH et atteints de COP. Au contraire, d'autres études ont montré une augmentation importante de la concentration de lactoferrine dans la salive de patients séropositifs atteints de COP

comparativement à des patients infectés au VIH sans COP (Atkinson et al., 1990; Lin et al., 2001). Les études sur le lysozyme sont tout aussi contradictoires, alors que certaines ont montré une diminution (Lin et al., 2001), tandis que d'autres une augmentation (Atkinson et al., 1990) de lysozyme dans la salive de patients infectés au VIH et atteints de COP. Finalement, l'histatine est sujette aux mêmes résultats contradictoires : une augmentation (Atkinson et al., 1990) ou une diminution (Mandel et al., 1992) de la concentration de celle-ci dans la salive de sujets séropositifs atteints de COP. Les concentrations de la calprotectine sont soit grandement diminuées (Muller et al., 1993; Sweet et al., 2001) ou soit augmentées chez les patients séropositifs atteints de COP (Eversole et al., 1993; Sweet et al., 2001). Comme les résultats de ces études ne concordent pas, il est difficile d'affirmer ou d'infirmer la participation de ces protéines parmi les mécanismes de défense contre *C. albicans* chez les patients infectés au VIH.

2.4.2 L'immunité innée

2.4.2.1 Les cellules épithéliales

Des études réalisées à l'aide de la microscopie électronique (Barr et al., 1992) et du PCR (Goto et al., 1991; Yeung et al., 1993) ont démontré que le VIH est présent dans la salive des patients séropositifs. Qureshi et al. (1997) ont observé que les cellules épithéliales de la muqueuse buccale de patients infectés par le VIH contiennent de l'ADN proviral intégré à l'intérieur de l'ADN de l'hôte ainsi que de l'ARN *tat* et *rev*. Steele et al. (2000) ont démontrés que les cellules épithéliales buccales, isolées chez des sujets sains, inhibent directement la croissance des blastoconidies et des hyphes de *C. albicans in vitro*. De plus, ils ont démontré que l'activité antifongique des cellules épithéliales buccales était diminuée chez les patients infectés au VIH et atteints de COP, comparativement à des patients infectés sans COP, ainsi qu'à des sujets non-infectés (Steele et al., 2000). L'établissement de la COP chez les patients infectés au VIH pourrait être expliqué, en partie, par la diminution de l'activité candidacide de leurs cellules épithéliales buccales.

2.4.2.2 Les cellules de Langerhans

C'est l'équipe de Tschachler et al. (1987) qui fut la première à identifier la présence d'antigènes du VIH contenus dans les LC provenant de biopsies de tissus de patients infectés au VIH. Par la suite, Zambruno et al. (1991) ont observé que des LC isolées de patients séropositifs contenaient des séquences d'ADN proviral du VIH. De plus, il a été démontré que les LC sont les premières cellules ciblées suite au contact du virus avec les muqueuses et que ceci menait invariablement au transfert du virus aux lymphocytes T CD4+ (Pope, 1999). Donc, les LC jouent le rôle de cheval de Troie dans l'infection au VIH, en transportant le virus vers les ganglions lymphatiques (Pope, 1999). Une des conséquences de l'infection au VIH est la diminution du nombre des cellules dendritiques du sang périphérique et de la rate (McIlroy et al., 1998; Barron et al., 2003). Le mécanisme de cette déplétion des LC demeure inconnu, mais des changements cytopathiques des LC causés par l'infection productive de VIH ont été impliqués (Chou et al., 2000). Une déplétion des LC dans l'œsophage et la muqueuse buccale de patients infectés au VIH a été observée (Charton-Bain et al., 1999; Chou et al., 2000). De plus, les LC infectées semblent exprimer moins de CMH de classe II et de CMH de classe I, et leur différenciation semble perturbée (Romagnoli et al., 1997; Kanazawa et al., 2000). La déplétion et l'altération de ces cellules pourraient expliquer en partie l'établissement de la COP chez les patients infectés au VIH.

2.4.2.3 Les cellules phagocytaires

L'infection au VIH est associée à une augmentation de macrophages et de neutrophiles au niveau des muqueuses des gencives atteintes d'inflammation chronique (Myint et al., 2002). Donc, le recrutement de ces cellules vers la muqueuse buccale ne semble pas altéré par le VIH.

Tout comme c'est le cas pour les LC, le VIH infecte les macrophages (Sonza et al., 1996). En effet, les macrophages expriment le corécepteur CD4+ qui permet au VIH de les infecter directement (Dukes et al., 1995). Meyaard et al. (1996) ont

observé un changement dans le profil des cytokines T_H1 vers T_H2 chez les patients infectés au VIH, incluant une diminution de la production d'INF- γ (principale cytokine activatrice des macrophages). Par ailleurs, la protéine Nef du VIH diminue l'expression du récepteur CD4 et du CMH de classe I à la surface des macrophages (Garcia et al., 1993; Anderson et al., 1994; Rhee et al., 1994; Schwartz et al., 1996; Le Gall et al., 1997). Une dysfonction des macrophages pourrait donc résulter de l'infection au VIH, mais les résultats obtenus demeurent contradictoires. En effet, il a été démontré que l'infection au VIH altère certaines fonctions effectrices des macrophages telles que la phagocytose (Kedzierska et al., 2000), la flambée oxydative (Ho et al., 1994; Trial et al., 1995; Lafrenie et al., 1996) et la production de cytokines (Kedzierska et al., 2001). Crowe et al. (1994) ont démontré que les macrophages, dérivés de monocytes provenant de patients infectés au VIH, ont une activité phagocytaire diminuée à l'égard de *C. albicans in vitro*. Par contre, d'autres chercheurs ont démontré que certaines fonctions des macrophages infectés par le VIH tels que la production d'anion superoxyde et la phagocytose de *C. albicans* sont normales (Nottet et al., 1993; Gordon et al., 2001).

La neutropénie est une conséquence reconnue de l'infection au VIH (Aboulafia et al., 1991). Certaines études ont démontré des altérations de la chimiotaxie, de la phagocytose, et de la capacité de tuer les bactéries chez les PMNs provenant de patients infectés au VIH (Ellis et al., 1988; Lazzarin et al., 1986; Nielsen et al., 1986). Toutefois, des résultats contradictoires ont été rapportés concernant l'activité de la flambée oxydative des PMNs dans le cadre de l'infection au VIH. Certains chercheurs ont observé une activité normale (Poli et al., 1985; Nielsen et al., 1986; Flo et al., 1994) et même augmentée (Ryder et al., 1988; Bandres et al., 1993), tandis que d'autres ont observés que l'activité de flambée oxydative était diminuée chez ces cellules (Muller et al., 1990; Spear et al., 1990; Chen et al., 1993; Pitrak et al., 1993). Une hypothèse possible d'explication est que ces différences soient attribuables, en partie, à l'utilisation de phagocytes de patients situés à différents stades de l'infection au VIH.

2.4.3 L'immunité à médiation cellulaire

2.4.3.1 Les lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T CD4+ sont, sans aucun doute, les cellules du système immunitaire les plus touchées par le VIH. Ils sont le réservoir majeur de VIH dans le sang périphérique et sont profondément déplétés au cours du développement de l'infection (Abbas et al., 2000). Plusieurs fonctions de ces cellules sont altérées par le VIH tel que la diminution de l'expression de l'IL-2 et du récepteur de l'IL-2, ainsi qu'une réponse proliférative réduite face à plusieurs antigènes (Kedzierska et al., 2003). De plus, à cause de l'expression du récepteur CD4 qui est diminuée par les protéines Vpu et Nef, les interactions entre le CMH de classe II et le CD4 deviennent de moins en moins fréquentes (Kedzierska et al., 2003). La COP semble associée directement ou indirectement à cette profonde déplétion des lymphocytes T CD4+. En effet, comme mentionné plus haut, cette infection opportuniste s'observe surtout lorsque le nombre de lymphocytes T CD4+ est inférieur à 400 cellules/mm³ de sang. De plus, plusieurs analyses du profil de cytokines dans la salive ont montré que le profil T_H2 domine, tandis que chez les personnes séronégatives, c'est le profil T_H1 qui est observé (Clerici et al., 1993). Ces changements corrént avec la perte de prolifération des lymphocytes du sang périphérique aux antigènes de *C. albicans* observée chez les patients au stade avancé de l'infection au VIH (Leigh et al., 1998). Toutefois, les perturbations des mécanismes spécifiques qui prédisposent à la susceptibilité à la COP chez les individus à la phase SIDA demeurent incomprises, et d'autres facteurs, en plus de la déplétion des lymphocytes T CD4+, pourraient y contribuer.

2.4.3.2 Les lymphocytes T CD8+

Les lymphocytes T CD8+ jouent un rôle important dans le contrôle des virus tels que le VIH et ceci, à cause de leur activité cytotoxique et de la relâche de facteurs solubles (Cocchi et al., 1995; Levy et al., 1996). Il a été observé chez les patients

infectés au VIH que le nombre de lymphocytes T CD8+ diminue dans le sang périphérique au cours de l'évolution de l'infection (Meyaard et al., 1992; Margolick et al., 1995). Herbein et al. (1998) ont montré que cette diminution est entre autres causée par l'induction de l'apoptose des lymphocytes CD8+ médiée par les macrophages, et plus particulièrement par l'interaction entre la protéine gp120 du VIH et le récepteur de chemokines CXCR4. Une étude récente effectuée sur des biopsies de muqueuses buccales de patients infectés au VIH et atteints de COP, a permis d'observer un recrutement et une accumulation de lymphocytes T CD8+ à l'interface de la lamina propria et de la couche basale de l'épithélium (Myers et al., 2003). Myers et al. (2003) ont suggéré à partir de ces observations que les lymphocytes T CD8+ pourraient avoir un rôle à jouer dans la défense de l'hôte contre *C. albicans*, et ceci spécifiquement lorsque le nombre de lymphocytes T CD4+ est réduit, comme c'est le cas chez les patients infectés au VIH.

2.4.4 L'immunité humorale

Le rôle protecteur d'anticorps sIgA spécifiques à *C. albicans* demeure assez contradictoire chez les patients infectés au VIH. Lin et al. (2001) ont observé que les patients infectés au VIH avaient de hauts niveaux d'IgA salivaires comparativement aux sujets témoins non-infectés. Au contraire, d'autres chercheurs n'ont observé aucun changement (Coates et al., 1992; Vudhichamnong et al., 1982; Mandel et al., 1992), et même une diminution (Muller et al., 1991; Sweet et al., 1995) de ces anticorps dans la salive des patients infectés au VIH. Plus récemment, Wozniak et al. (2002) ont quantifié le répertoire complet d'anticorps dans la salive, en portant une attention particulière au décompte de lymphocytes T CD4+ et en normalisant les données en fonction de la concentration des protéines salivaires. Ces résultats ont permis de démontrer qu'il n'y a pas de différence entre les niveaux d'IgA ou de sIgA chez les patients infectés au VIH atteints ou non de COP.

CHAPITRE 3 : ÉTUDE DE LA PATHOGENÈSE DE LA COP À L'AIDE DE MODÈLES ANIMAUX

Les modèles animaux représentent des outils essentiels afin d'approfondir l'étude de la pathogenèse de la candidose, tant au niveau moléculaire que cellulaire (Samaranayake et al., 2001a). Ceci est en partie dû aux dilemmes éthiques encourus par l'utilisation d'humains, la difficulté de se procurer des tissus humains ainsi qu'aux avantages que procure l'utilisation des animaux de laboratoire. En effet, il est possible, par l'utilisation de modèles animaux, de contrôler presque la totalité des facteurs qui peuvent entraîner des biais dans la cueillette de données tels que l'environnement (température, luminosité, humidité, etc.), la durée de l'infection, l'alimentation, l'âge et le sexe des sujets. L'utilisation de modèles animaux nous permet aussi de comparer directement les différents résultats obtenus par rapport aux témoins, ainsi que d'obtenir des observations à temps fixes et statutaires. De plus, la clonalité de *C. albicans* est assurée, permettant aussi d'éviter les infections humaines causées par de multiples souches de *C. albicans*. Ainsi, il est donc possible de véritablement faire des analyses de cause à effet pour l'étude des interactions hôte-pathogène.

3.1 Les modèles animaux de candidose oropharyngée dans le cadre de l'infection au VIH-1

3.1.1 Les modèles animaux de candidose oropharyngée

Plusieurs modèles animaux ont été créés et utilisés afin d'élucider la pathogenèse de la candidose oropharyngée. Différentes espèces animales ont été utilisées jusqu'ici (rats, lapins et singes), mais c'est la souris qui est sans aucun doute l'espèce procurant le plus d'avantages pour faire ces analyses (Samaranayake et al., 2001a). La souris est peu coûteuse, de petite taille, se reproduit aisément, ne requiert pas énormément de soins, et est facilement modifiable génétiquement afin de reproduire

des perturbations spécifiques au niveau immunitaire de l'hôte (souris transgéniques et *knockout*). Toutefois, une différence notable existe entre la souris et l'homme dans ce type d'étude : *C. albicans* ne fait pas parti de la flore microbienne normale de la souris (Lacasse et al., 1990). C'est pourquoi il est nécessaire de procéder à une infection expérimentale chez la souris afin d'engendrer le phénotype de la candidose. Les modèles animaux qui sont utilisés afin de mieux comprendre cette pathogenèse sont de différentes constitutions et peuvent être classés globalement selon leurs caractéristiques prédominantes. Plusieurs de ces études sont effectuées uniquement à l'aide de souris normales infectées oralement par *C. albicans*. Ces études visent essentiellement à tenter de disséquer et comprendre l'immunité chez un hôte normal face à une infection par *C. albicans* (Elahi et al., 2000; Elahi et al., 2001; Ashman et al., 2003). La plupart des autres études sur la COP utilisent des modèles animaux qui ont soit subi un traitement visant l'immunodépression ou l'altération de l'immunité, comme par exemple par l'irradiation des animaux (Farah et al., 2001a; Farah et al., 2001b) ou par l'injection de cortisone (Kamai et al., 2001; Kamai et al., 2002), ou qui ont soit des immunodéficiences au niveau de l'immunité innée et/ou acquise (Farah et al., 2002a; Farah et al., 2002b; Cantorna et al., 1990; Romani et al., 1997; Vazquez-Torres et al., 1995) ou encore soit des modèles de souris modifiées génétiquement (souris transgéniques ou *knockout*) (Balish et al, 2001; Jones-Carson et al., 2000; Balish et al., 1999; Balish et al., 1996; Balish et al, 1998). Les différents modèles animaux énumérés ici sont plutôt utilisés afin de mimer certaines perturbations immunes, telles des immunodéficiences, qui permettront d'obtenir de nouvelles informations au sujet de la pathogenèse de la candidose oropharyngée tant au niveau moléculaire que cellulaire.

3.1.2 Les modèles animaux de COP dans le cadre de l'infection au VIH-1

Jusqu'à tout récemment, l'étude de la pathogenèse de la COP dans le cadre de l'infection au VIH-1 était très limitée à cause de l'absence d'un modèle animal approprié. Plusieurs équipes de recherche ont tenté de faire exprimer les produits de gènes du VIH-1 chez des souris, mais ces études n'ont pas résulté en la création d'un

modèle animal satisfaisant (Brady et al., 1994; Klotman et al., 1996). En effet, chez certains de ces modèles, de nouvelles caractéristiques non-observées chez l'humain infecté sont apparues, alors que chez d'autres, des phénotypes essentiels du SIDA humain n'ont pu ou ont minimalement pu être observés.

C'est l'équipe de Deslauriers et al. (1997) qui a pour la première fois créé un modèle animal de COP partageant des ressemblances avec l'infection au VIH. Cette étude a été réalisée en utilisant des souris C57BL/6 infectées par un rétrovirus responsable de la leucémie murine, le Du5H (G₆T₂). Ce virus est l'agent du SIDA murin (MAIDS) et ce dernier partage plusieurs caractéristiques immunologiques retrouvées chez les patients infectés par le VIH-1. Ces caractéristiques incluent (i) une prolifération polyclonale des lymphocytes B manifestée par une hypergammaglobulinémie, une lymphadénopathie et une splénomégalie ; (ii) une défaillance dans les fonctions T_H1 des lymphocytes T CD4⁺ avec une diminution de production d'IL-2 et d'IFN- γ ; (iii) l'activation des lymphocytes T CD4⁺ T_H2 observée par l'augmentation de la production d'IL-4, IL-5, IL-6, et IL-10 ; (iv) la perte progressive des réponses des lymphocytes T CD8⁺ cytotoxiques ; et (v) la susceptibilité accrue aux infections et aux lymphomes constitués de lymphocytes B. Suite à l'infection expérimentale avec *C. albicans*, les souris ont été examinées pour leur habileté à résister au développement de la candidose buccale. Les souris ont développé en moins de 10 jours un état de porteur chronique, qui s'est stabilisé et qui a duré plus de 6 mois. Il a été observé chez 70% de ces souris une stabilisation au niveau des décomptes buccaux à partir du jour 10 post-infection. Des périodes de fluctuations, de 2 à 3 semaines, durant lesquelles de hauts niveaux de décomptes de *C. albicans* ont été suivis de périodes de convalescence, ont été observés chez 30% des sujets. La principale limite de ce modèle pour l'étude de la COP est que la déplétion des lymphocytes T CD4⁺, qui est une caractéristique essentielle de la progression de l'infection par le VIH, n'est pas observée au cours du développement du MAIDS. Donc ce modèle est plutôt adapté pour les études concernant les étapes précoces de l'infection au VIH (Mosier, 1986).

3.2 La COP chez la souris CD4C/HIV^{Mut}

Récemment, nous avons eu l'opportunité de poursuivre les études concernant la COP dans le cadre de l'infection au VIH chez une souris transgénique mimant de très près le SIDA humain et présentant la plupart des phénotypes cellulaires retrouvés lors de l'infection au VIH-1 (Hanna et al., 1998). Cette souris, la souris CD4C/HIV^{Mut}, provient du laboratoire du Dr. Paul Jolicoeur avec lequel nous collaborons depuis déjà 3 ans afin d'élucider la pathogenèse de la candidose oropharyngée dans le contexte de l'infection au VIH. Ces souris présentent la plupart des phénotypes retrouvés chez l'homme tels que l'atrophie thymique, la perte préférentielle des lymphocytes T CD4+, la pneumonie et la néphrite interstitielles, la cardiomyopathie, la perte de poids, la diarrhée, le retard de croissance et la mort prématurée (Hanna et al., 1998). La particularité qui fait l'unicité de ce modèle est l'expression du transgène du VIH-1 et ce, uniquement dans les cellules ayant le récepteur CD4, c'est-à-dire les mêmes populations cellulaires qui sont infectées par le VIH-1 chez l'humain (voir matériel et méthodes pour plus de détails). Ces cellules sont les lymphocytes T thymiques CD4+CD8+ immatures, les lymphocytes T CD4+CD8- matures, les lymphocytes T CD4+ matures périphériques et aussi les macrophages et les cellules dendritiques (Hanna et al., 1998). De plus, tout comme il est observé chez les patients infectés au VIH, les lymphocytes T CD8+ périphériques augmentent en nombre au début, mais diminuent au cours du développement de la maladie (Hanna et al., 1998; Fauci et al., 1996). Plusieurs lignées de souris ont été créées avec différentes délétions au niveau des gènes du VIH-1 afin de constater que seul le gène *nef* est suffisant et nécessaire afin d'engendrer les différents phénotypes reliés au SIDA (figure 9) (Hanna et al., 1998).

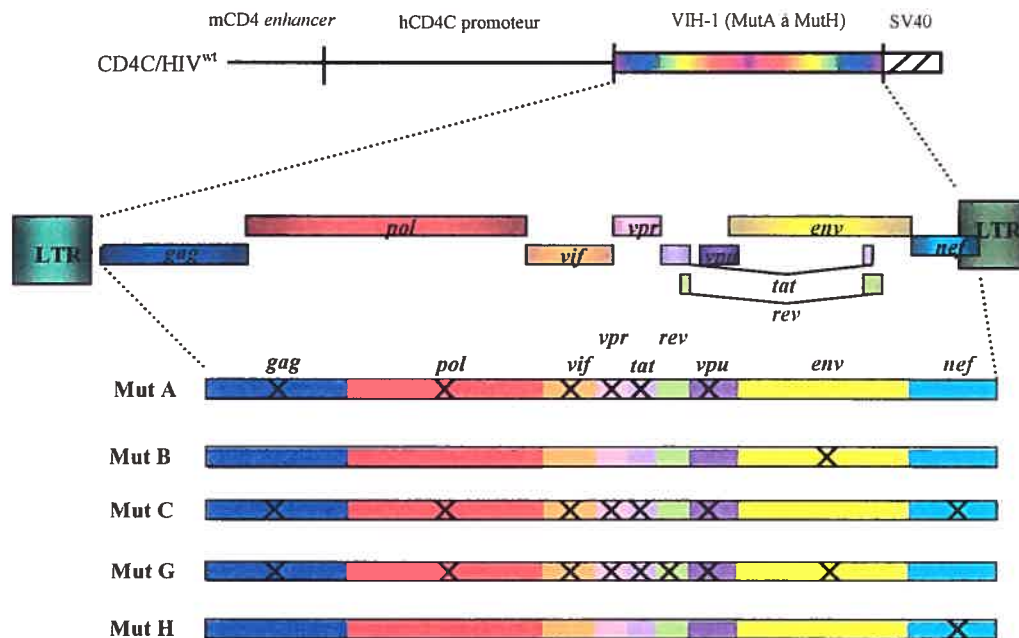


Figure 9. Structure des transgènes CD4C/HIV^{Mut}. Le fragment *enhancer* de souris du gène CD4 (mCD4), le promoteur humain CD4 (hCD4), chacun des génomes mutants du VIH-1 (MutA à MutH), et les séquences de polyadénylation du virus simien 40 (SV40), furent liés. Le symbole (X) signifie que les cadres de lecture ouverts (ORF) du génome du VIH indiqués sont interrompus. Inspiré de Hanna et al., 1998.

Des études antérieures, réalisées dans notre laboratoire, nous ont permis d'établir un nouveau modèle de COP chez la souris CD4C/HIV^{MutA} (de Repentigny et al., 2002). En effet, une semaine environ après l'infection buccale de ces souris avec *C. albicans*, nous avons pu observer l'établissement d'un état de porteur chronique soutenu, qui dure entre 6 et 10 semaines, et qui est suivi d'une augmentation drastique des niveaux de décomptes buccaux lors du développement de la maladie, pour se terminer par la mort des animaux. De plus, il a été observé, que les hyphes de *C. albicans* pénètrent la couche superficielle de l'épithélium pavimenteux stratifié de la cavité buccale et de l'œsophage, qu'il y a une très faible incidence de dissémination de la levure aux organes internes, et qu'une infiltration en

foyers de cellules mononucléées apparaît au niveau de la muqueuse. Toutes ces caractéristiques observées chez la souris transgénique sont identiques à celles retrouvées chez l'humain infecté au VIH-1 et développant la COP (Fong et al., 1997; Yeh et al., 1988). Des analyses immunohistochimiques des muqueuses buccales et œsophagiennes nous ont permis d'observer une diminution de la fréquence de cellules exprimant le CMH de classe II, combinée avec une réduction de lymphocytes T CD4+ chez les souris Tg comparativement aux souris témoins non-Tg (de Repentigny et al., 2002).

Toutes les caractéristiques font de ce modèle animal un choix judicieux afin de mieux comprendre la pathogenèse de la candidose.

RAISONNEMENT ET HYPOTHÈSES

Prenant en considération les faits suivants :

- i. Les lymphocytes T CD4+ sont graduellement déplétés au cours de la progression de l'infection au VIH ;
- ii. L'incidence et la prévalence de la COP s'accroissent à la phase SIDA (lymphocytes T CD4+ < 200/mm³) ;
- iii. Dans le cadre de l'infection au VIH se compliquant de COP, le nombre de lymphocytes T CD8+ au niveau de la muqueuse buccale est augmenté au stade précoce de l'infection au VIH, mais diminue à la phase SIDA ;
- iv. Malgré l'effet fongistatique des lymphocytes T CD8+ démontré à l'égard de *C. albicans in vitro*, aucune étude n'a jusqu'à maintenant démontré la participation directe (cytotoxicité) ou indirecte (production de cytokines) de ces cellules à la défense contre la COP ;
- v. Une augmentation de cellules appartenant à la lignée des monocytes/macrophages a été observée au niveau de la muqueuse buccale des souris Tg infectées à *Candida* et ce, de la primo-infection à la phase tardive de la maladie apparentée au SIDA ;

- vi. Une infiltration de PMNs est observée dans la muqueuse buccale de souris immunocompétentes au cours de l'infection primaire au *C. albicans* ;
- vii. Les phagocytes sont les principales cellules effectrices impliquées dans l'élimination de *C. albicans*
- viii. L'altération fonctionnelle des phagocytes au cours de l'infection au VIH demeure controversée ;
- ix. Chez les patients infectés au VIH et atteints de COP ainsi que chez la souris Tg infectée à *C. albicans*, il y a peu ou pas de dissémination systémique du champignon aux organes internes.

Nous proposons les hypothèses suivantes concernant l'immunopathogénèse de la COP chez la souris Tg exprimant le génome du VIH-1 :

- (i) Les lymphocytes T CD8+, les monocytes/macrophages, les PMNs, ou encore l'association de ces populations cellulaires préviennent la dissémination systémique de *C. albicans* chez la souris Tg;
- (ii) Ces mêmes populations cellulaires effectrices réduisent la charge de *C. albicans* au niveau de la muqueuse buccale chez la souris Tg.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Souris Tg exprimant le VIH-1

La construction et la caractérisation des souris Tg CD4C/HIV^{Mut} ont été réalisées au laboratoire du docteur Paul Jolicoeur (Institut de recherches cliniques de Montréal) (figure 9) (Hanna et al., 1998). Brièvement, l'ADN CD4C/HIV^{Mut} mutant contient des séquences amplificatrices (*enhancer*) CD4 de souris et des éléments du promoteur CD4 humain permettant l'expression des gènes du VIH-1 chez la souris Tg. Ainsi, le transgène s'exprime exclusivement dans les cellules possédant le récepteur CD4 tel que les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4+ et les macrophages. Les souris fondatrices F21388 et F27367 provenant respectivement

des lignées CD4C/HIV^{MutA} et CD4C/HIV^{MutG} ont été utilisées. Ces deux souris fondatrices ont été croisées, au départ, avec une souris de génotype C3H et les souris de la progéniture ont été génotypées et examinées quotidiennement pour tout signe de maladie. Les souris Tg de la lignée MutA expriment modérément le transgène et ont une survie moyenne de 3 mois, tandis que les souris MutG, qui ont une demi-vie de 10 mois, l'expriment à un faible niveau. Une corrélation entre le niveau d'expression du transgène et de la maladie a été démontrée chez ces souris Tg CD4C/HIV^{Mut} (Hanna et al., 1998). Plusieurs gènes du VIH-1 (*gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *tat*, et *vpu*) sont mutés dans l'ADN des souris MutA alors que les gènes *env*, *rev* et *nef* sont intacts. La souris MutG a *nef* comme seul gène intact du VIH-1. Il a été démontré que le gène *nef* est essentiel et suffisant afin d'engendrer une maladie mimant le SIDA chez ces souris Tg. Cette maladie est caractérisée par une perte de poids, un retard de croissance, l'atrophie sévère et la fibrose des organes lymphoïdes, la perte préférentielle des lymphocytes T CD4+, la pneumonie et la néphrite interstitielles (Hanna et al., 1998). Ces changements ne sont pas observés chez les souris témoins non-Tg (Hanna et al., 1998).

Les souris Tg CD4E/HIV^{MutG} (Hanna, en préparation) ont été produites à partir de l'ADN CD4C en remplaçant le fragment Sac I de 2.6 kpb par le promoteur de souris (Hanna et al., 2001) le tout lié à de l'ADN HIV^{MutG} (Hanna et al., 1998). Ces souris Tg expriment de façon sélective le gène *nef* dans les thymocytes CD4+ CD8+, dans les lymphocytes T CD4+ périphériques, dans un faible nombre de lymphocytes T CD8+, et dans les cellules dendritiques, mais pas dans les macrophages (Hanna et al., 2001).

Les souris mCD4C/HIV^{MutG} (Hanna, en préparation) ont été créées en liant les éléments régulateurs CD4C de souris à l'ADN HIV^{MutG}. L'expression du gène *nef* chez ces souris est restreinte aux lymphocytes T CD4+. Il est possible que la cause soit l'absence du gène CD4 humain dans cette construction.

Les souris Tg et non-Tg sont exemptes de pathogènes spécifiques et sont hébergées à l'animalerie de l'Université de Montréal. Afin d'éviter toute infection potentielle provenant de l'environnement, les souris sont placées dans des cages

stérilisées et équipées de bonnets-filtres. Les animaux sont alimentés de nourriture et d'eau stérile. En plus des souris non-Tg, des souris C3H de 5 à 6 semaines (17 à 18 grammes) provenant de Charles River Canada ont été utilisées comme témoins immunocompétents, et pour l'entretien de la colonie de souris Tg.

Modèle animal de la candidose des muqueuses

Quelques colonies de *C. albicans* LAM-1 furent déposées dans du milieu Sabouraud dextrose liquide (Difco Laboratories) pour 18 h à 30°C avec agitation afin d'obtenir des levures en phase de croissance logarithmique tardive. Les levures ont été lavées deux fois dans du PBS 0,01 M (pH 7,4) stérile et ont été comptées à l'aide d'un hématimètre. Les souris ont été anesthésiées par injection intra-péritonéale avec 0,1 ml d'une solution contenant 1 ml d'Hypnorm (0,315 mg/mL de citrate de fentanyl et 10 mg/ml de fluanisone ; Janssen Pharmaceutica), 1 ml de Versed (5mg/ml de midazolam ; Hoffmann-La Roche), et 2 ml d'eau stérile. Les souris ont alors été inoculées avec 10^8 blastoconidies de *C. albicans*, par application topique à la cavité buccale (joues, palais dur et mou, langue) à l'aide de tiges stériles d'alginate de calcium (Calgiswabs ; Fisher Scientific).

Les souris ont été observées quotidiennement pour tout signe de morbidité, et leurs poids ont été enregistrés du début à la fin de l'expérience. Les animaux moribonds ont été notés comme non-survivants et ont été euthanasiés par inhalation de CO₂.

Une quantification longitudinale de *C. albicans* dans la cavité buccale des souris individuelles a été réalisée à partir du jour 1 jusqu'à l'euthanasie des animaux. Les cotons-tiges en alginate de calcium ont été utilisés pour frotter la muqueuse buccale (joues, palais dur et mou, langue) et ont par la suite été dissous dans du tampon citrate Ringer. Des dilutions sériées furent préparées dans du PBS stérile (0,05 M, pH 7,4) et étalées sur des Pétris de Sabouraud dextrose supplémentés avec du chloramphénicol (0,05g/l). Les Pétris ont été incubés pour 24 h à 37°C. Les colonies cultivées ont ensuite été comptées et les cfu ont pu être calculés.

Afin de déterminer la charge de *C. albicans* dans le tractus gastrointestinal et le potentiel de dissémination systémique, le cerveau, le foie, les poumons, les reins, l'estomac, le petit intestin et le gros intestin furent prélevés aseptiquement des animaux, pesés et ensuite homogénéisés dans 5 ml de PBS stérile. Des dilutions sériées ont ensuite été effectuées à partir des broyats puis étalées sur des Pétris de Sabouraud dextrose supplémentés avec du chloramphénicol, et incubés 24 h à 37°C. Les données ont été exprimées en cfu par gramme de tissus.

Immunohistochimie

La rate, la langue, l'intestin et l'estomac incluant le repli non-glandulaire ont été prélevés et placés dans des moules « Peel-Away »® en plastique remplis d'OCT (10,24% (wt/wt) d'alcool polyvinyle, 4,26% (wt/wt) de polyéthylène glycol et 85,50% (wt/wt) d'ingrédients non-réactifs) (Miles Scientific, Napierville, QC). Le moule fut ensuite plongé 30 sec dans du 2-méthylbutane préalablement refroidi dans de l'azote liquide. Après congélation, le bloc a été placé sur glace sèche et conservé à -80°C jusqu'à utilisation. Des coupes de 6 µm d'épaisseur ont été déposées sur des lames de microscope Superfrost Plus (Fisher).

Les anticorps primaires utilisés étaient les suivants : anticorps monoclonal de hamster anti-souris TCR $\gamma\delta$ (GL3 ; PharMingen); anticorps monoclonal de rat anti-souris CD11b (M1/70 ; PharMingen); anticorps monoclonal de hamster anti-souris CD11c (HL3 ; PharMingen); anticorps monoclonal de rat anti-souris CD8 α (Ly-2 ; ParMingen)

Toutes les incubations ont été faites à température pièce, en chambre humide. Les coupes de tissus sur lames ont été préalablement fixées 2 min dans l'acétone (-80°C), puis séchées pendant 1 h. Les lames utilisées immédiatement ont été lavées trois fois dans du PBS 0,01M et les autres lames ont été conservées à -80°C. Les coupes utilisées ont été traitées au Dako Biotin Blocking System (pour bloquer la biotine endogène contenue dans certaines coupes de tissus) pendant 20 min. Après 3

lavages de 2 min, les coupes ont été mises en présence d'une solution de H₂O₂ à 0,03% pendant 10 min, suivi d'un lavage. Les coupes ont ensuite été incubées dans une solution de blocage contenant 5% (w/w) d'albumine de sérum de bœuf dans du PBS pendant 30 min. Les coupes ont été incubées pendant 1 h avec les anticorps TCR $\gamma\delta$, CD11b, CD11c, ou CD8 α , aux concentrations respectives de 2,5 μ g/ml, 4 μ g/ml, et 4,2 μ g/ml. Les témoins négatifs ont été incubés dans du PBS. Les coupes ont été lavées 3 fois et l'anticorps secondaire biotiné fut ajouté pendant 30 min (pour TCR $\gamma\delta$, CD11b, CD8 α , immunoglobulines biotinées de lapin anti-rat (Dako), et pour CD11c, un mélange d'anticorps biotiné de souris anti-hamster (PharMingen)). Après 3 lavages, les anticorps liés ont été détectés au moyen du complexe streptavidine-peroxidase (Dako) dilué dans du Tris 0,05M, pH 7,2 contenant 0,1 M de NaCl, 30 min. Finalement, les coupes ont été lavées et les cellules marquées ont pu être visualisées à l'aide de la diaminobenzidine (DAB) (Dako). Une contre-coloration du tissu fut réalisée à l'hématoxyline de Meyer. Les témoins négatifs furent obtenus en ajoutant du PBS au lieu de l'anticorps primaire, tandis que les témoins positifs étaient réalisés à l'aide de rates de souris CH3. Finalement, les lames ont été observées en microscopie optique. Les densités de cellules marquées furent déterminées qualitativement sur plus de 20 champs microscopiques (grossissement, X400).

Déplétion des PMN circulants à l'aide d'un anticorps monoclonal

L'anticorps monoclonal RB6-8C5 (PharMingen, Canada) réagit avec l'antigène de surface Ly-6G, connu comme l'antigène de différenciation myéloïde Gr-1, une protéine d'ancrage GPI de 21-25 kDa exprimée à la surface des granulocytes murins (Fleming et al., 1993). Cet anticorps monoclonal est un IgG2b, κ de rat qui se lie sélectivement aux neutrophiles et éosinophiles matures, mais pas aux lymphocytes et macrophages (Conlan et al., 1994; Tepper et al., 1992). L'anticorps monoclonal purifié a été injecté par la voie intrapéritonéale (i.p.) à la dose de 50 μ g, et l'isotype de rat IgG2b, κ (A95-1) (PharMingen) fut administré comme témoin IgG à d'autres groupes de souris. Des expériences préliminaires nous ont permis de déterminer qu'un traitement à l'aide de 50 μ g d'Acm par souris réduit de 90 à 98% le nombre de

PMNs circulants pour une durée de deux jours. Nous avons par la suite déterminé qu'il était possible d'administrer jusqu'à 3 doses de 50 µg consécutives à l'intervalle de deux jours, permettant de maintenir la déplétion soutenue des PMNs pendant 7 jours (>90% de déplétion). À 24 h après le premier traitement, le nombre de PMNs circulants (moyenne ± écart type) a diminué de $4135 \pm 1057/\text{mm}^3$ chez les témoins à $13 \pm 10/\text{mm}^3$ chez les souris traitées et cette déplétion s'est maintenue pendant 7 jours consécutifs.

Énumération des leucocytes du sang périphérique

Afin de vérifier l'efficacité de l'Acm anti-Ly6G à dépléter les PMNs, des prélèvements sanguins ont été effectués quotidiennement par la veine saphène des souris concernées. Des frottis sanguins ont été colorés au May-Grunwald Giemsa afin de quantifier le nombre différentiel de leucocytes, et le nombre total de leucocytes a été déterminé à l'aide du Système Unopette (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ). Le nombre absolu de chacune des populations leucocytaires/ mm^3 de sang fut ensuite calculé en multipliant le pourcentage de ces cellules par le nombre de leucocytes totaux du sang périphérique.

Mesure de l'activité enzymatique des PMNs

Pour quantifier cette activité, nous avons utilisé le substrat dichlorofluoresceine diacetate (DCFH-DA) (DCFH•Peroxides, CellProbesTM Reagents). Le DCFH-DA est transporté à travers la membrane plasmique de la cellule et est déacétylé par les estérases pour former un composé intermédiaire non-fluorescent, le DCFH (figure 10). Le DCFH est converti en un composé hautement fluorescent, le DCF, par l'action de la peroxydase et de la production de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ceci nous permet donc de mesurer la présence de peroxyde due à la flambée oxydative des PMNs.



Figure 10. Réaction chimique de la conversion du substrat non fluorescent DCFH-DA en un composé (DCF) hautement fluorescent par l'action des enzymes intracellulaires des PMNs.

Pour chaque expérience, un total de 2 ml de sang hépariné ont été recueillis par ponction cardiaque chez 2 souris préalablement anesthésiées. Les érythrocytes ont été lysés à l'aide d'une solution de lyse pour globules rouges (155mM de NH_4Cl , 10mM de KHCO_2 et 0,1 mM d'EDTA à 0,5M) pour 5 min, puis centrifugés. Les leucocytes recueillis ont été lavés deux fois avec du PBS stérile puis ajustés à la concentration de $3 \pm 0.5 \times 10^6$ cellules/ml dans du *Hanks' balanced salt solution* (HBSS ; Gibco, Grand Island, NY), et la viabilité cellulaire était >97% par exclusion du bleu de trypan.

Pour chaque tube, 50 ul de la suspension cellulaire a été chauffé pour 10 min dans un bain-marie à 37°C. Le réactif CellProbe™ a été reconstitué avec 250 ul d'eau distillée juste avant l'utilisation. À la fin de l'incubation de 10 min, 25 ul de ce réactif a été ajouté à chaque tube, délicatement mélangé et remis aussitôt à 37°C pour exactement 5 min. Pour chaque expérience, un tube témoin a été préparé en remplaçant le réactif par 25 ul de HBSS. Les tubes ont été retirés et déposés sur de la glace broyée afin d'arrêter la réaction enzymatique. Ensuite, 0,5 ml de HBSS froid a été ajouté à chaque tube juste avant l'analyse par cytofluorométrie en flux. Les échantillons ont été analysés au FACS dans un délai de 15 min afin d'éviter une perte de fluorescence ou encore un marquage non spécifique. Les PMNs ont été délimités en fonction de leurs caractéristiques morphologiques (taille et structure de la cellule), et l'intensité de la fluorescence des PMNs a été mesurée. Les résultats ont été calculés en soustrayant de la fluorescence moyenne des PMNs avec enzyme, la fluorescence moyenne des PMNs témoin. Un minimum de 4 réplicatas ont été

effectués au cours de chaque expérience indépendante. Les analyses ont été effectuées à l'aide d'un cytofluoromètre FACStar (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) équipé d'un logiciel Consort 30. Un minimum de 10 000 évènements ont été recueillis à l'intérieur de la borne délimitant les PMNs.

Déplétion des monocytes circulants et des macrophages de la muqueuse buccale

La déplétion de ces populations cellulaires a été réalisée à l'aide de liposomes contenant du clodronate, fournis par le Dr Nico Van Rooijen du Département de biologie cellulaire à l'Université d'Amsterdam (Pays-Bas). Les liposomes multilamellaires ont été préparés comme décrit précédemment (Van Rooijen et al., 1994), contenant soit l'agent cytolytique (le dichlorométhylène diphosphate, Cl₂MDP ; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Allemagne) ou soit du PBS. Brièvement, 75 mg de phosphatidylcholine et 11 mg de cholestérol (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO) ont été dissouts dans du chloroforme et ont été évaporés par rotation sous vide à 37°C. Ensuite, ils ont été dispersés en mélangeant avec 10 ml de PBS (0,15 M NaCl ; 10 mM de tampon phosphate, pH 7,3) contenant 2,5 g de Cl₂MDP pour 10 min. Les liposomes ont ensuite été laissés à température pièce pour 2 h, puis soniqués pour 3 min à la température pièce dans un sonicateur et ensuite gardés à la température pièce pour 2 h. Les liposomes ainsi produits (L-Cl₂MDP) ont été lavés et centrifugés à 100 000 X g dans du PBS pour 30 min à deux reprises afin d'enlever le Cl₂MDP non séquestré. Les L-Cl₂MDP ont ensuite été suspendus dans 4 ml de PBS.

Afin d'obtenir la déplétion des monocytes/macrophages du sang périphérique, du foie et de la rate ainsi que de la muqueuse buccale, nous avons injecté 0,15 ml par la voie intraveineuse et 0,025 ml par voie intra jugale (0,012 ml par joue) de liposomes contenant du clodronate. Les témoins négatifs ont reçu soit des liposomes-PBS ou soit du PBS au lieu des L-Cl₂MDP.

Suspensions cellulaires de la rate, des ganglions lymphatiques cervicaux et de la muqueuse buccale

Le sang hépariné de souris préalablement anesthésiées a été recueilli par ponction cardiaque. La rate et les ganglions lymphatiques cervicaux ont été prélevés, pressés à travers une membrane de nylon (grosueur des pores, 80 μm), et enfin déposés dans des Pétris de 25 mm de diamètre contenant 2 ml de HBSS. La suspension cellulaire a ensuite été lavée 2 fois dans du HBSS et resuspendue dans un milieu de culture complet constitué de milieu RPMI 1640 (Gibco) supplémenté avec 10% de sérum fœtal de veau inactivé à la chaleur (Gibco), 20 mM de tampon HEPES, 2mM de L-glutamine, 5×10^{-5} M de β -mercaptoéthanol, 100 U/ml de pénicilline et de streptomycine, 0,25 $\mu\text{g/ml}$ d'amphotéricine B, et 50 $\mu\text{g/ml}$ de gentamicine. Afin d'obtenir une suspension cellulaire homogène, les cellules ont ensuite été filtrées à travers une membrane de nylon stérile (grosueur des pores, 20 μm).

La technique de prélèvement des muqueuses buccale a été effectuée tel que mise au point dans notre laboratoire (Lewandowski, D., en préparation). Brièvement, la muqueuse buccale, incluant les joues, le palais dur et le palais mou a été disséquée en évitant la couche musculaire et lavée 5 min dans une solution tampon de lavage (20 mM de TRIS, 20 mM de NaCl, 40 mM d'EDTA, et 1 mM de DTT) afin d'enlever le mucus à la surface. Les tissus ont ensuite été lavés dans du HBSS, coupés longitudinalement, et finalement émincés en fragments de 1 mm^2 avec un scalpel stérile dans du milieu complet. Les tissus émincés contenant l'épithélium et la lamina propria ont été digérés en les incubant dans 0.25% de collagénase de type IV (Sigma) dans du milieu complet à 37°C pour 30 min avec légère agitation. Le milieu a ensuite été remplacé et la suspension a été remise en incubation pour 30 min. Les débris de tissus ont été exclus en filtrant la suspension cellulaire de muqueuses orales 2 fois à travers une membrane de nylon de 20 μm , et celle-ci a ensuite été lavée dans du HBSS.

La contamination par les érythrocytes dans la suspension cellulaire ainsi obtenue a été estimée à <1% en se fondant sur le ratio érythrocytes : leucocytes. Les

suspensions cellulaires de rate, de ganglions lymphatiques cervicaux et de la muqueuse buccale ont été suspendues dans du milieu complet et ajustées à 1×10^6 cellules/ml, et la viabilité cellulaire était $>90\%$ par exclusion du bleu de trypan.

Cytométrie en flux

L'analyse de marqueurs de surface cellulaire sur les lymphocytes du sang périphérique a été effectuée tel que décrit précédemment (de Repentigny, 2002), à l'aide d'un cytomètre en flux FACSCalibur (BD Biosciences) équipé du logiciel CellQuest. La rate et les ganglions lymphatiques cervicaux ont été marqués directement à l'aide d'anticorps monoclonaux fluorescents spécifiques pour le CD3 (145-2C11) de souris, le CD4 (L3T4) de souris, et le CD8 (53-6.7) de souris, ainsi que leurs isotypes respectifs (l'IgG1 de rat et l'IgG2b de rat) (BD Biosciences) et les cellules de la muqueuse buccale ont été marquées directement à l'aide d'anticorps monoclonaux fluorescents spécifiques pour le CD11b (M1/70) de souris, l'I-A^k (CMHII, 11-5.2) de souris, le CD11c (HL3) de souris, ainsi que leurs isotypes respectifs (l'IgG2b,k de rat, l'IgG2b,k de souris et l'IgG2a,k de souris) (BD Biosciences) à $1 \mu\text{g}/10^6$ cellules pour 45 min à 4°C. Afin de lyser les érythrocytes encore présents dans la suspension cellulaire de la rate, 1 ml de tampon de lyse pour érythrocyte (BD Biosciences) a été ajouté à 100 μl de la suspension pour 5 min. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois dans du PBS froid et fixées avec de la paraformaldéhyde à 2%.

Les splénocytes ont servi de témoin afin de comparer les profils SSC et FSC des populations cellulaires en cytométrie en flux aux profils des populations cellulaires de la muqueuse buccale. Durant l'acquisition des données, un minimum de 10 000 événements dans la borne ont été recueillis. Les cellules incubées avec le témoin isotype ont servies à déterminer la fluorescence endogène des cellules.

Analyses statistiques

Les différences au niveau des cfu buccaux de *C. albicans* entre chaque groupe de souris ont été déterminées à l'aide du logiciel PROC MIXED version 8, logiciel 16 (SAS Institute, Cary, NC). Des analyses de la variance de mesures répétées avec des ajustements à l'aide du test de Tukey-Kramer ont été réalisées à l'aide de 2 facteurs, le premier étant le groupe de souris et le second le temps d'infection. Les interactions significatives ($p < 0,05$) ont été attentivement analysées et les différences significatives ($p < 0,05$) entre les moyennes des groupes à un temps déterminé ont été analysées en utilisant le test de t de Student bilatéral à deux échantillons indépendants. Une analyse de variance à un facteur a été utilisée pour l'analyse des marqueurs de surface cellulaire des souris CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO et une ANOVA à deux facteurs répétés (temps et groupes) pour les analyses concernant l'activité enzymatique et les populations leucocytaires du sang périphérique. Finalement, le test de Mann-Whitney a été utilisé afin d'analyser les données concernant les analyses des marqueurs de surface cellulaires des souris mCD4C/HIV^{MutG} et CD4E/HIV^{MutG}. Les différences ont été considérées significatives à $p < 0,05$.

RÉSULTATS

Analyses immunohistochimiques de la muqueuse buccale de la souris Tg CD4C/HIV^{MutA} infectée avec *C. albicans*. Les muqueuses buccales de six souris Tg ont été analysées par immunohistochimie afin (i) d'identifier le phénotype de l'infiltration de cellules mononucléées observée précédemment dans la lamina propria des souris Tg infectées avec *C. albicans* (de Repentigny, 2002), et (ii) vérifier si l'incidence et la distribution des populations cellulaires effectrices à l'égard de *C. albicans* (lymphocytes T $\gamma:\delta$ et macrophages) sont altérées chez la souris Tg infectée avec *C. albicans*.

La déplétion profonde et progressive des lymphocytes T CD4⁺ au niveau de la muqueuse buccale des souris Tg infectées par *C. albicans* après la primo-infection, et de façon plus marquée à la fin de la vie de ces souris, comparativement aux souris non-Tg infectées, a été observée précédemment dans notre laboratoire (de Repentigny, 2002) (figure 11). L'infiltration de cellules mononucléées apparaissant chez la souris Tg infectée par *C. albicans* à la fin de la primo-infection et persistant jusqu'à la fin de l'infection était du phénotype de la lignée des monocytes/macrophages (CD11b⁺, I-A^k⁺, CD11c⁻). De plus, une augmentation importante des lymphocytes T CD8⁺ dans la muqueuse buccale de la souris Tg infectée par *C. albicans* a été observée à la fin de la primo-infection, suivie d'une importante déplétion à la fin de la vie de ces souris comparativement aux souris non-Tg infectées. Finalement, une augmentation transitoire des lymphocytes T γ : δ , suite à la primo-infection, a été observée chez la souris Tg infectée par *C. albicans* comparativement à la souris non-Tg infectée.

Ces résultats indiquent que les lymphocytes T CD8⁺ et γ / δ ⁺ pourraient jouer un rôle dans la récupération de la primo-infection au *C. albicans* chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutA}, tout en limitant la prolifération de *C. albicans* à la muqueuse buccale. De plus, l'activité fongicide exercée par les cellules de la lignée des monocytes/macrophages à l'égard de *C. albicans* pourrait être en partie conservée malgré l'expression du transgène.

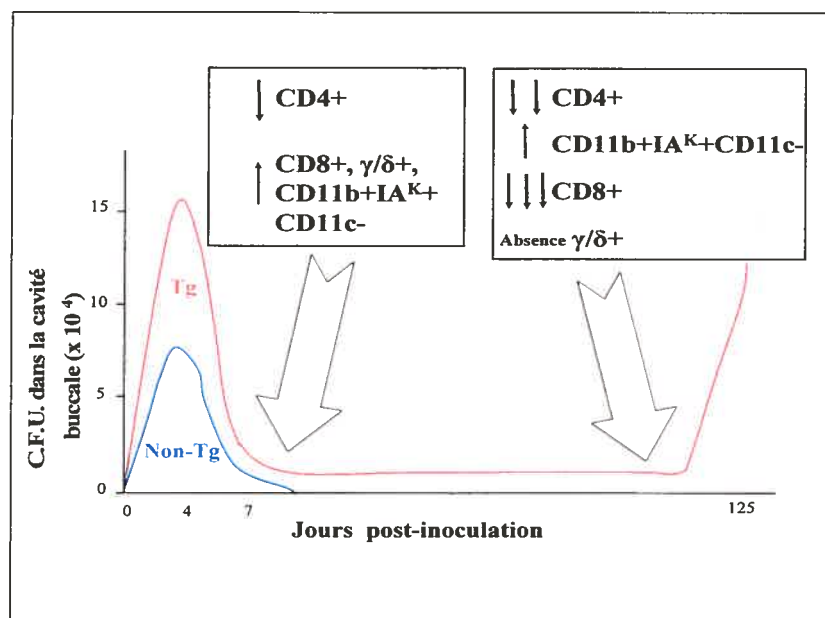


Figure 11. Analyse immunohistochimique de la muqueuse buccale de la souris Tg CD4C/HIV^{MutA} infectée avec *C. albicans*.

Déplétion des PMN à l'aide d'un anticorps monoclonal (RB6-8C5) chez la souris Tg infectée par *C. albicans*. Deux expériences indépendantes de déplétion des PMNs ont été effectuées : la première fut exécutée aussitôt après la primo-infection, soit 20 jours après l'infection des souris (figure 12) et la deuxième au milieu de la phase de porteur chronique de *C. albicans* chez la souris Tg, soit 45 jours post-inoculation du champignon (figure 14). Pour chaque expérience, douze souris Tg CD4C/HIV^{MutA} et six souris non-Tg ont été inoculées intra-oralement avec 10⁸ cfu (*colony-forming units*) de *C. albicans* LAM-1. Les décomptes buccaux ont été déterminés longitudinalement en procédant à des écouvillonnages de la cavité buccale (figures 12 et 14). À partir du jour 20 ou 45 post-inoculation, six souris Tg et non-Tg ont été traitées à l'aide de l'anticorps monoclonal (Acm) RB6-8C5, et ce afin de dépléter les PMNs circulants. Les six autres souris Tg ont reçu un isotype IgG. Ces traitements ont été administrés à tous les 2 jours et les souris ont été euthanasiées au 7^{ième} jour après le début du traitement. Afin de vérifier l'ampleur de la neutropénie, des prélèvements sanguins ont été effectués quotidiennement dès le premier jour d'administration du traitement (figures 13 et 15). Pendant le traitement,

plus de 90% des PMNs circulants furent déplétés chez les souris ayant reçu l'Acm (figures 13 et 15).

À partir des jours 20 ou 45, et ce jusqu'au moment de l'euthanasie des animaux (jours 27 et 52 respectivement), les décomptes buccaux ne furent pas significativement différents ($P > 0,05$) entre les souris Tg traitées à l'aide de l'Acm et les souris Tg ayant reçu l'isotype (figures 12B et 14C). De plus, l'administration d'Acm après la primo-infection de la souris non-Tg n'a pas entraîné de colonisation de la muqueuse buccale par *C. albicans*.

Des décomptes comparables de colonies de *C. albicans* ont été obtenus dans l'estomac, le petit intestin et le gros intestin des souris Tg déplétées et non déplétées de leurs PMNs, après euthanasie des souris aux jours 27 et 52 post-inoculation de *C. albicans* (tableau I). De faibles décomptes de *C. albicans* (moins de 10^3 cfu chez la souris non-Tg comparativement à plus de 10^4 cfu chez les souris Tg) furent trouvées dans ces mêmes organes, et ce chez seulement la moitié des souris non-Tg. Dans les organes internes, aucune dissémination de *C. albicans* n'a été observée, tant chez les souris Tg déplétées que chez les deux groupes témoins (souris Tg/isotype et souris non-Tg/RB6-8C5). Toutes les souris ont survécu jusqu'au jour de l'euthanasie.

Ces résultats démontrent que, suite à la primo-infection et pendant la phase de porteur chronique de *C. albicans* chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutA}, les PMNs sont ni essentiels pour restreindre la charge de *C. albicans* à la surface de la muqueuse buccale ni nécessaires pour empêcher la dissémination systémique du champignon aux organes profonds.

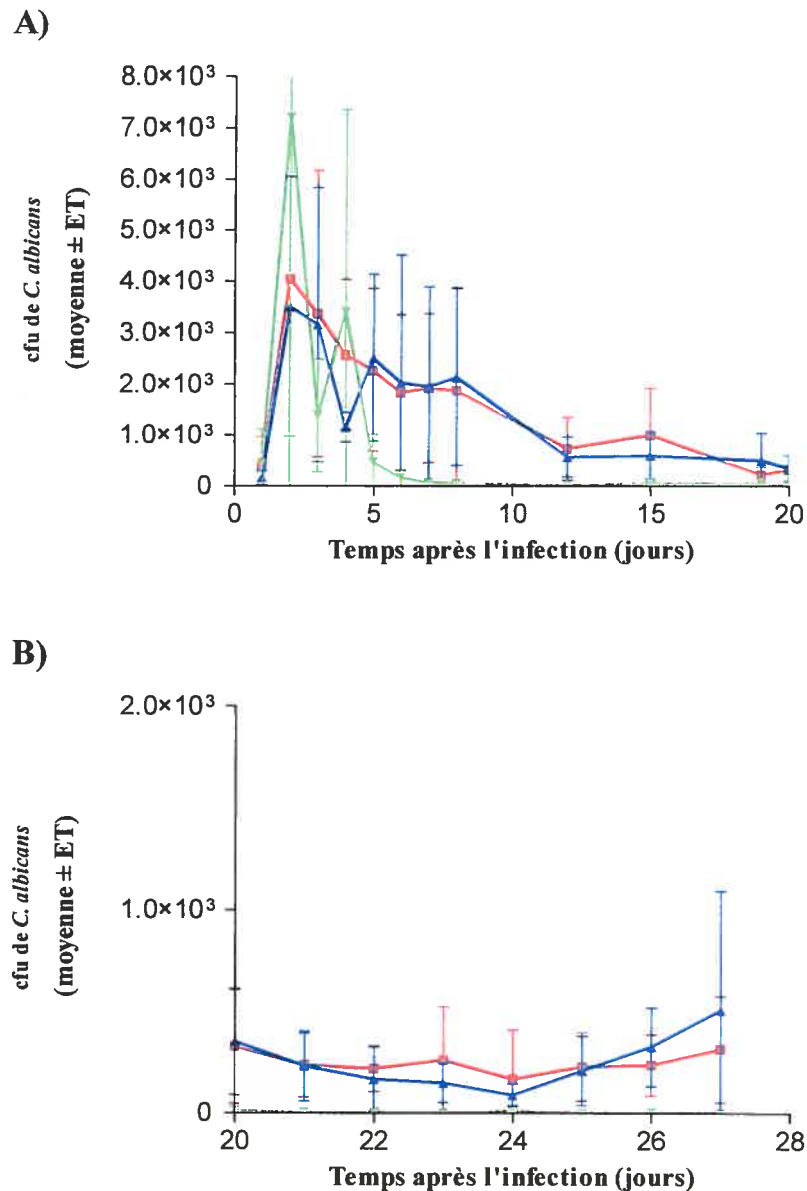


Figure 12. Décomptes buccaux de *C. albicans* retrouvés chez la souris Tg traitée avec un isotype IgG (ligne bleue), et chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutA} (ligne rouge) et non-Tg (lignes vertes) traitées avec l'Acm RB6-8C5 (A et B). À partir du jour 20 (B), chaque groupe de souris a subi son traitement respectif tous les 2 jours jusqu'au jour du sacrifice (jour 27). Les décomptes buccaux des souris Tg déplétées n'étaient pas significativement différents ($p > 0,05$) de ceux des souris Tg ayant reçu l'isotype, et ce avant et après l'administration du traitement. Les résultats représentent la moyenne des cfu \pm l'écart type calculé pour chaque groupe de souris

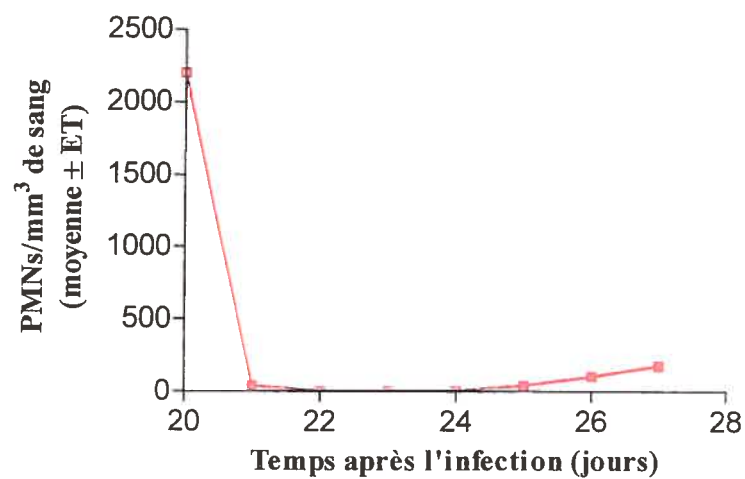
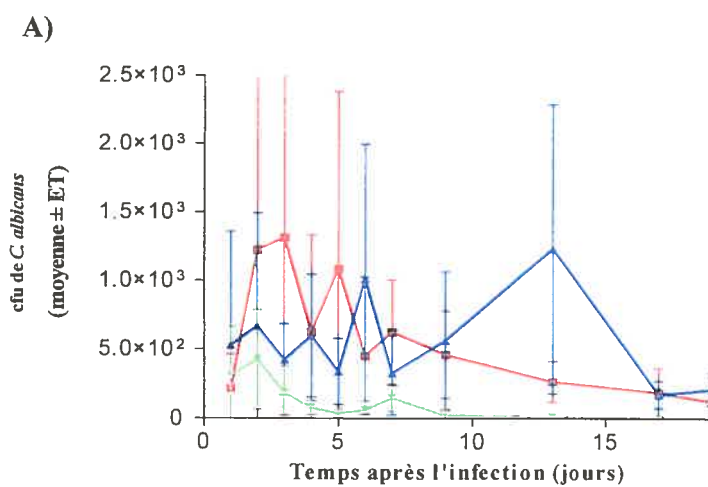


Figure 13. Nombre absolu de PMNs retrouvés dans la circulation sanguine des souris Tg et non-Tg ayant reçu l'Acm du jour 20 au jour 27 post-inoculation de *C. albicans*. Vingt-quatre heures après le début du traitement (jour 21), plus de 92% des PMNs circulants ont été déplétés et cette neutropénie fut maintenue pour une période de 7 jours.



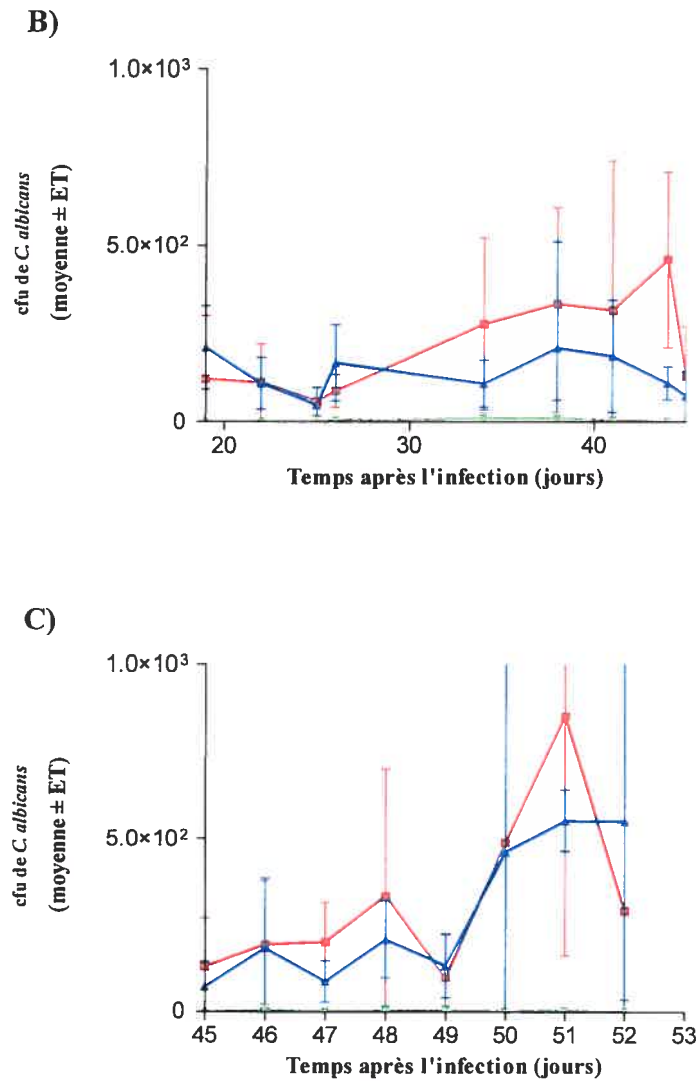


Figure 14. Décomptes buccaux de *C. albicans* retrouvés chez la souris Tg traitée avec un isotype IgG (ligne bleue), et chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutA} (ligne rouge) et non-Tg (lignes vertes) traitées avec l'Acm RB6-8C5 (A, B et C). À partir du jour 45 (C), chaque groupe de souris a subit son traitement respectif à tous les 2 jours jusqu'au jour du sacrifice (jour 52). Les décomptes buccaux des souris Tg déplétées n'étaient pas significativement différents ($p > 0,05$) de ceux retrouvés chez les souris Tg ayant reçu l'isotype, et ce avant et après l'administration du traitement. Les résultats représentent la moyenne des cfu \pm l'écart type calculé pour chaque groupe de souris.

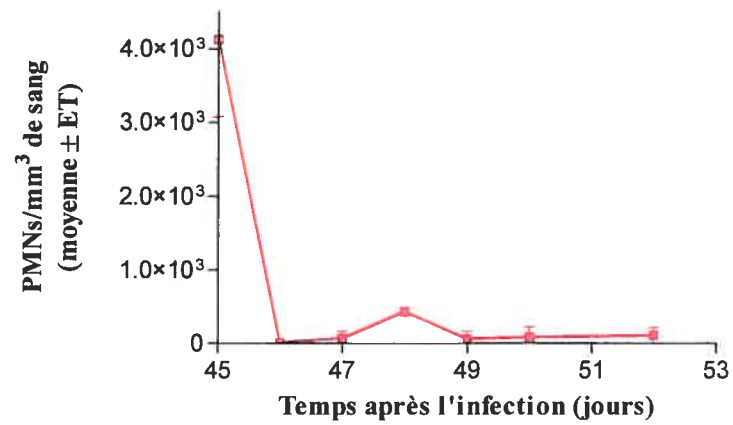


Figure 15. Nombre absolu de PMNs retrouvés dans la circulation sanguine des souris Tg et non-Tg ayant reçu l'Acm du jour 45 au jour 52 post-inoculation de *C. albicans*. Vingt-quatre heures après le début du traitement (jour 46), plus de 90% des PMNs circulants ont été déplétés chez ces souris et cette neutropénie fut maintenue pour une période de 7 jours.

Tableau I. Unités de colonies viables dans les organes (cfu/gramme) des souris Tg CD4C/HIV^{MutA} inoculées de *C. albicans* intra-oralement, et ayant subi une déplétion des PMNs pendant 7 jours à l'aide de l'Acm RB6-8C5 débutant aux jours 20 et 45 post-inoculation.

Variable	Souris ^a					
	Euthanasie jour 27			Euthanasie jour 52		
	Tg / RB6-8C5	Tg / IgG	Non-Tg / RB6-8C5	Tg / RB6-8C5	Tg / IgG	Non-Tg / RB6-8C5
Nombre de souris inoculées	6	6	6	7	6	7
Age à l'inoculation, moyenne des jours (écart)	50 (43-57)	50 (43-57)	50 (43-57)	57 (49-64)	57 (49-64)	57 (49-64)
Age à l'euthanasie, moyenne des jours (écart)	77 (70-84)	77 (70-84)	77 (70-84)	109 (101-116)	109 (101-116)	109 (101-116)
Culture d'organes positive pour <i>C. albicans</i>						
Cerveau						
Nombre de souris	0	0	0	0	0	0
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ecart	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Poumons						
Nombre de souris	0	0	0	0	0	0
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ecart	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Foie						
Nombre de souris	0	0	0	0	0	0
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Ecart	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Variable	Euthanasie jour 27			Euthanasie jour 52		
	Tg / RB6-8C5	Tg / IgG	Non-Tg/RB6-8C5	Tg / RB6-8C5	Tg / IgG	Non-Tg/RB6-8C5
Souris^a						
Reins						
Nombre de souris	0	0	0	0	0	0
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Écart	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Estomac						
Nombre de souris	6	6	1	6	4	1
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	$1,8 \times 10^5$	$2,2 \times 10^5$	$2,1 \times 10^2$	$1,1 \times 10^5$	$2,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^2$
Écart	$5,1 \times 10^2 - 3,9 \times 10^5$	$3,4 \times 10^3 - 5,9 \times 10^5$	NA	$2,4 \times 10^4 - 3,5 \times 10^5$	$2,1 \times 10^5 - 2,8 \times 10^5$	NA
Petit intestin						
Nombre de souris	6	6	3	7	5	3
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	$2,6 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$	$2,2 \times 10^2$	$1,5 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$2,9 \times 10^1$
Écart	$8,7 \times 10^2 - 6,4 \times 10^4$	$5,2 \times 10^2 - 8,1 \times 10^4$	$2,5 \times 10^1 - 5,1 \times 10^2$	$2,1 \times 10^3 - 4,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^3 - 3,9 \times 10^4$	$1,9 \times 10^1 - 4,8 \times 10^1$
Gros intestin						
Nombre de souris	6	6	2	7	6	4
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	$2,0 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	$5,1 \times 10^2$	$1,0 \times 10^5$	$9,0 \times 10^4$	$1,6 \times 10^2$
Écart	$1,6 \times 10^4 - 4,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^4 - 4,4 \times 10^5$	$2,6 \times 10^2 - 7,6 \times 10^2$	$3,8 \times 10^3 - 3,0 \times 10^5$	$2,3 \times 10^3 - 3,2 \times 10^5$	$2,7 \times 10^1 - 3,3 \times 10^2$

NOTE : NA, ne s'applique pas.

^a Les souris étudiées incluent les rejets Tg et non-Tg de la souris fondatrice F21388.

Mesure de l'activité enzymatique des PMNs. Cette expérience a été réalisée à la fin de la primo-infection (jour 7) (figure 16A) ainsi qu'à la fin de la phase de porteur chronique (jour 70) (figure 16B) de *C. albicans*. Pour chacun de ces temps, quatre groupes de huit souris ont été constitués : des souris Tg CD4C/HIV^{MutA} et des souris non-Tg infectées intra-oralement avec 10^8 cfu de *C. albicans*, et des souris Tg CD4C/HIV^{MutA} et des souris non-Tg non-infectées. Afin d'obtenir une quantité suffisante de PMNs permettant de mesurer l'activité enzymatique des souris, le sang de deux souris par groupe a été réuni, produisant ainsi quatre observations pour chacun des groupes aux deux temps à l'étude. Après avoir isolé les PMNs à l'aide de gradients de densité, la pureté de la population cellulaire se situait entre 90 et 95% de PMNs et la viabilité cellulaire était de 98%. L'intensité de la fluorescence, mesurée à l'aide du cytomètre en flux (FACS), représente la capacité des enzymes intracellulaires responsables de la flambée oxydative (NADPH oxydase et superoxyde dismutase) à produire du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et de l'anion superoxyde (O_2^-).

Au jour 7 post-infection (figure 16A), l'activité enzymatique des PMNs était légèrement augmentée chez les souris Tg et non-Tg infectées à *C. albicans* comparativement aux souris non-infectées. De plus, l'activité enzymatique des PMNs était plus élevée à 70 jours (figure 16B) chez les souris Tg et non-Tg infectées ainsi que chez la souris Tg non-infectée, comparativement aux mêmes groupes de souris à 7 jours post-infection. Toutefois, une seule différence significative ($p < 0,05$) a été observée, entre le groupe de souris non-Tg non-infectées et le groupe de souris Tg infectées et ce, tant à 7 qu'à 70 jours post-infection à *C. albicans* (figure 16A et 16B). Il semble donc que la présence du transgène additionné de l'infection à *C. albicans* soient nécessaire afin d'obtenir une augmentation significative de l'activité enzymatique. Par ailleurs, le phénotype de candidose chronique chez la souris Tg ne s'accompagne pas d'une perturbation de la flambée oxydative des PMNs.

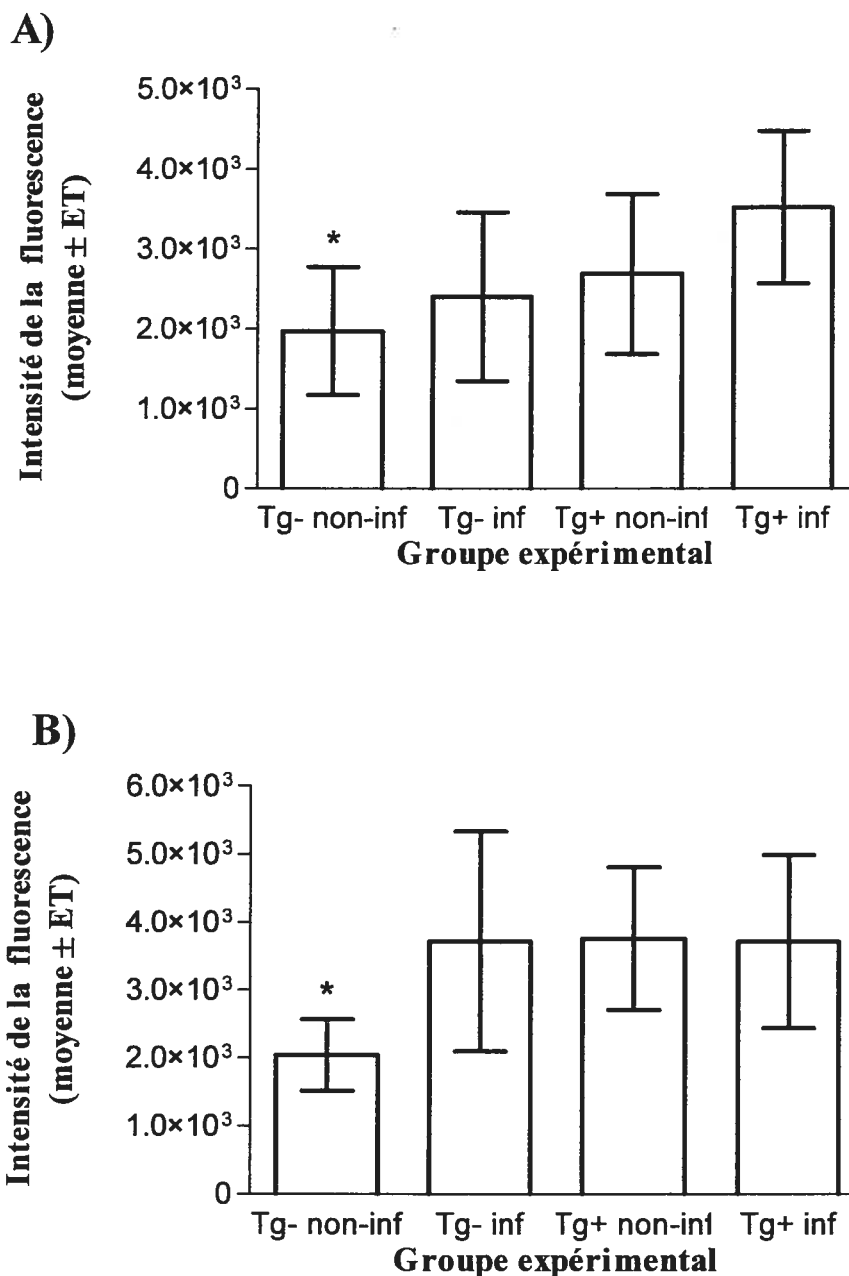


Figure 16. Mesures de la flambée oxydative (moyenne \pm écart type) des PMNs isolés des souris non-Tg et Tg infectées par *C. albicans*, ainsi que des souris non-Tg et Tg non-infectées, et ce à 7 jours (A) et à 70 jours (B) post-infection. Une différence significative (*, $p < 0,05$) est observée entre le groupe de souris non-Tg non-infectées et le groupe de souris Tg infectées et ce pour les deux temps à l'étude.

Énumération des leucocytes du sang périphérique. Des formules sanguines ont été réalisées et le nombre absolu de chaque population leucocytaire a été calculé chez quatre groupes de six souris chacun (souris Tg CD4C/HIV^{MutA} infectées et non-infectées, ainsi que souris non-Tg infectées et non-infectées), aux jours 7 (figure 17A), 45 (figure 17B) et 70 (figure 17C) post-infection par *C. albicans*.

À 7, 45 et 70 jours post-infection (A, B et C), le nombre absolu de leucocytes circulants était comparable parmi les quatre groupes de souris ($p > 0,05$). Toutefois, le nombre de lymphocytes, pour ces trois temps d'infection (A, B et C), était diminué chez les souris Tg infectées et non-infectées comparativement aux souris non-Tg ($p < 0,05$). De plus, tout au long de la progression de la maladie, le nombre de lymphocytes était significativement supérieur ($p < 0,05$) chez les souris non-Tg non-infectées comparativement aux souris non-Tg infectées.

Une diminution significative ($p < 0,05$) du nombre de PMNs entre le groupe de souris non-Tg non-infectées et les trois autres groupes de souris a été observée et ce, indépendamment du moment de l'infection (A, B et C). De plus, toujours indépendamment du temps, une augmentation significative ($p < 0,05$) du nombre de PMNs a été observée chez les souris Tg infectées comparativement aux trois autres groupes de souris. Aucune différence significative ($p > 0,05$) n'a été observée entre le nombre de PMNs chez les souris non-Tg infectées et Tg non-infectées.

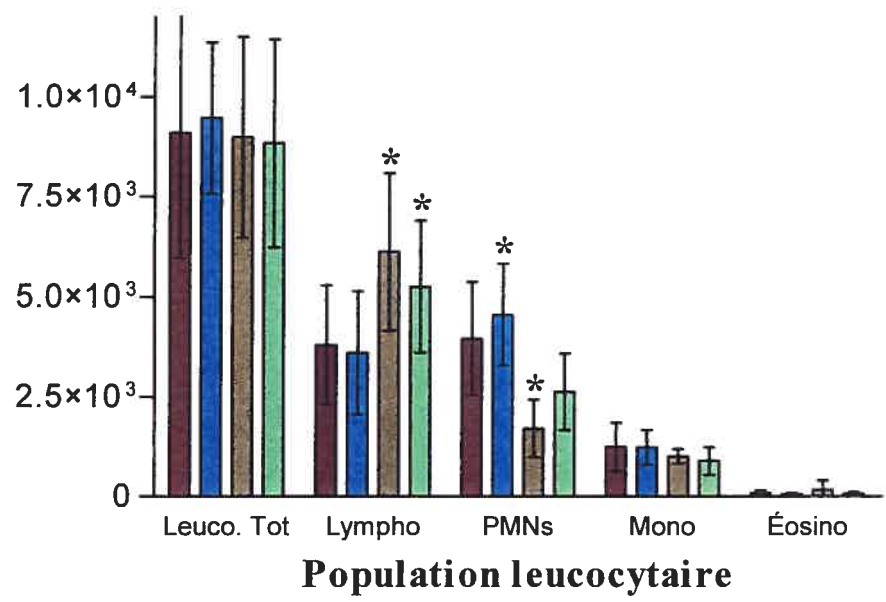
Aucune différence notable ne fut observée entre le nombre absolu de monocytes et le nombre absolu d'éosinophiles parmi les quatre groupes de souris. Toutefois, une augmentation significative ($p < 0,05$) du nombre de monocytes circulants entre les jours 7 et 70 a été constatée et ce, pour les 4 groupes de souris A, B et C).

Les souris Tg infectées et non-infectées subissent, tout au long de la progression de la maladie apparentée au SIDA, une déplétion progressive du nombre de lymphocytes T circulants comparativement aux groupes de souris non-Tg analogues. Cette diminution a déjà été démontrée, tant aux dépens des lymphocytes T CD4+ que des lymphocytes T CD8+, dans notre laboratoire par cytométrie en flux (de

Repentigny, 2002). De plus, la souris Tg infectée possède une augmentation marquée du nombre de PMNs comparativement aux trois autres groupes de souris à l'étude. L'augmentation du nombre de PMNs circulants chez la souris Tg non-infectée comparativement à la souris non-Tg non-infectée a été observée précédemment (Jolicoeur, 1998).

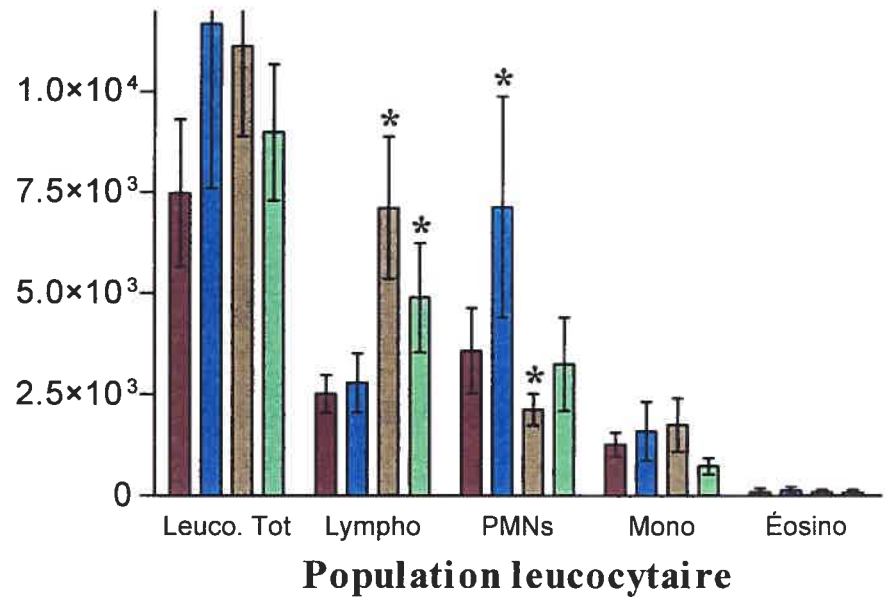
A) J7

NB de leucocytes/mm³ de sang
(moyenne \pm ET)



B) J45

NB de leucocyte/mm³ de sang
(moyenne \pm ET)



C) J70

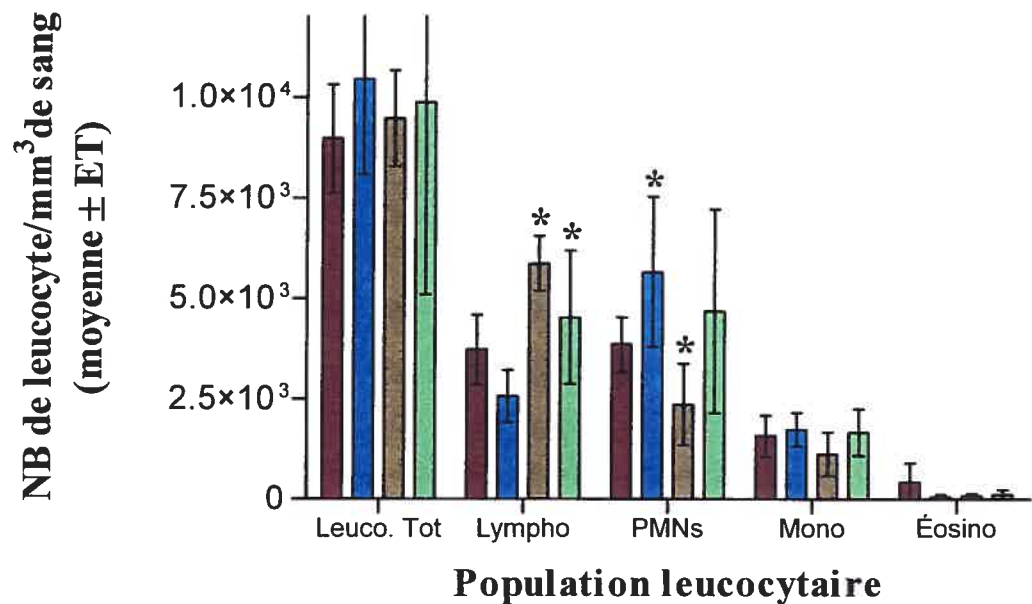


Figure 17. Dénombrement des leucocytes du sang périphérique des souris Tg non-infectées (rouge) et infectées (bleu), ainsi que des souris non-Tg non-infectées (jaune) et infectées (vert). Les prélèvements sanguins ont été effectués à 7 jours (A), 45 jours (B) et 70 jours (C) post-infection avec *C. albicans*. Les résultats représentent la moyenne \pm l'écart type de chaque population leucocytaire. Indépendamment du temps, des différences significatives (*, $p < 0,05$) sont observées entre le nombre de lymphocytes retrouvé chez les deux groupes de souris Tg et les deux groupes de souris non-Tg, ainsi qu'entre les souris non-Tg non-infectées et non-Tg infectées. Le nombre de neutrophiles est significativement différent (*, $p < 0,05$) entre le groupe de souris non-Tg non-infectées et les trois autres groupes, ainsi qu'entre les souris Tg infectées et les trois autres groupes de souris et ce, indépendamment du temps de l'infection. Le nombre de monocytes circulants augmente significativement ($p < 0,05$) en fonction du temps de l'infection et ce, pour les 4 groupes de souris.

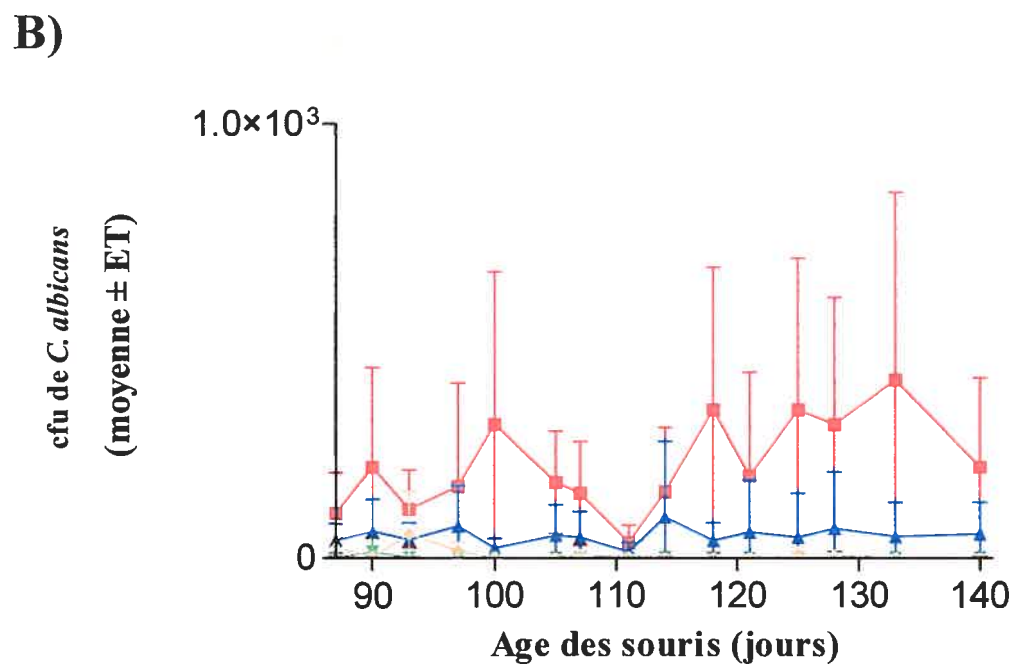
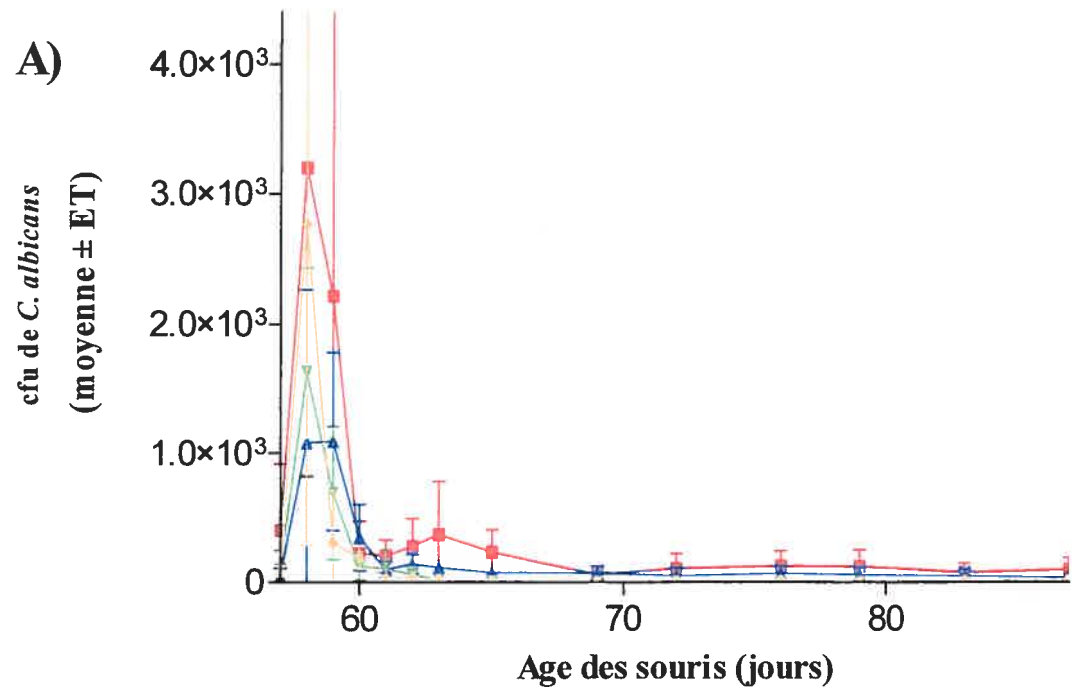
Évaluation de la charge buccale et de la dissémination systémique de *C. albicans* chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO – Première expérience. Six souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO, six souris CD4C/HIV^{MutG}, six souris CD8 KO et six souris non-Tg ont été inoculées intra-oralement avec 10^8 cfu de *C. albicans* LAM-1. Les décomptes buccaux ont été déterminés longitudinalement en procédant à des écouvillonnages de la cavité buccale. Après la primo-infection (figure 18A) et durant la phase de porteur chronique (figure 18B à E), les décomptes buccaux étaient plus élevés chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO comparativement à ceux des souris Tg CD4C/HIV^{MutG}. Par contre, immédiatement après la primo-infection, le *C. albicans* a été rapidement éliminé de la cavité buccale des souris CD8 KO et des souris non-Tg. Les décomptes buccaux étaient significativement plus élevés chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO que chez les souris Tg ($p < 0,05$) durant un court laps de temps suite à la primo-infection (entre 65 et 67 jours) (figure 18A). De plus, durant la phase de porteur chronique (entre 90 à 189 jours) (figures 18B et C), la différence entre ces deux groupes était presque significative ($p = 0,06$) et, à partir du jour 162 (figures 18C à E), aucune différence significative n'a été observée ($p > 0,05$). De plus, une différence significative ($p < 0,05$) fut constatée entre les groupes exprimant le transgène et les groupes CD8 KO et non-Tg, et ce tout au long de l'expérience. Les souris CD8 KO et les souris non-Tg avaient éliminé le *C. albicans* dans les quelques jours suivant la primo-infection. Ces résultats suggèrent que les lymphocytes T CD8+ pourraient jouer un rôle dans la défense de l'hôte contre *C. albicans* au niveau de la muqueuse buccale chez la souris Tg, et ce tôt après la primo-infection et pendant la phase de porteur chronique. De plus, les lymphocytes T CD8+ ne sont essentiels au contrôle de la candidose qu'en présence du transgène puisque l'absence de lymphocytes T CD8+ chez la souris non-Tg a aucun impact sur les décomptes buccaux. Comme il existe une très grande variabilité entre les décomptes buccaux de chacune des souris d'un même groupe, cette expérience a été répétée afin d'augmenter le nombre de sujets par groupe et ainsi mieux déceler les différences ($p < 0,05$) entre les souris Tg CD8 KO et Tg.

Des décomptes élevés de *C. albicans* ($\geq 10^3$ cfu) furent retrouvés dans l'estomac et dans les intestins de plus de la moitié des souris CD4C/HIV^{MutG} CD8

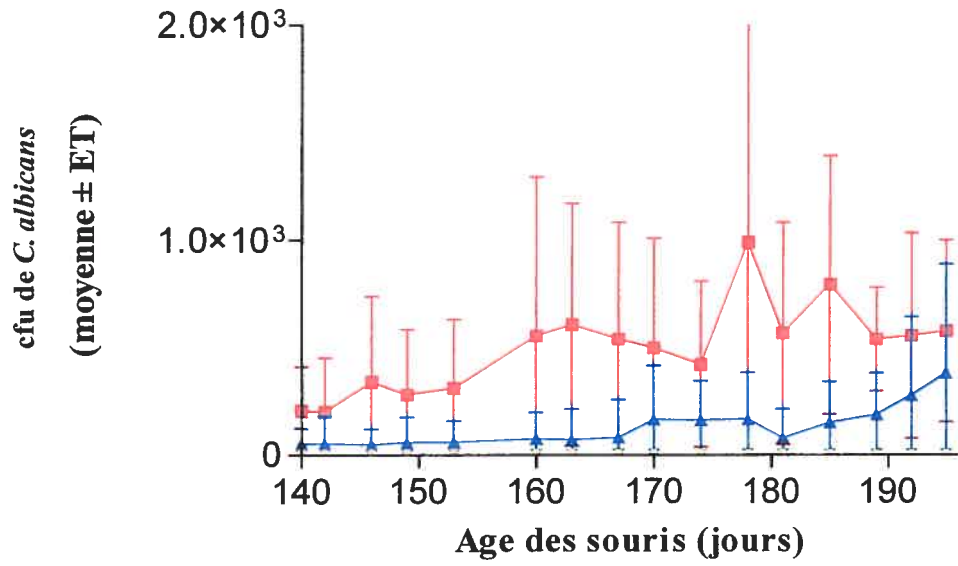
KO et des souris CD4C/HIV^{MutG} et, étonnamment, dans ceux des souris non-Tg (tableau II). Inversement, le *C. albicans* ne fut pas observé dans ces organes de la souris CD8 KO. La dissémination de *C. albicans* au cerveau et au foie a été observée chez 4 et une des 6 souris Tg CD8 KO. De plus, *C. albicans* a été cultivé de l'ensemble des organes internes de deux des six souris Tg. Étonnamment, une dissémination de *C. albicans* fut observée dans le cerveau des six souris CD8 KO. De plus, une dissémination systémique de *C. albicans* a été retrouvée dans le foie et dans les reins de la majorité des souris non-Tg, ainsi que dans les poumons et le cerveau d'une de ces six souris. Chez les quatre groupes de souris à l'étude, l'identification sur les Pétris de Sabouraud de deux microorganismes opportunistes autres que *C. albicans*, pourrait en partie expliquer les décomptes retrouvés dans les organes des souris témoins (ces résultats ne sont pas présentés). En effet, tel qu'identifiés, la plupart des Pétris concernés contenaient du *Candida guilliermondii* ainsi que du *Pseudomonas spp.* Une hypothèse possible serait que la présence de ces microorganismes pourrait avoir entraîné l'altération de certains mécanismes de défense immunitaire qui sont normalement impliqués dans la défense de la muqueuse buccale contre la dissémination de *C. albicans*. Ces souris proviennent de l'IRCM, où elles ont été produites dans un environnement exempt de microorganismes pathogènes. Dès leur arrivée dans notre laboratoire, une attention particulière leur a été portée afin d'empêcher toute possibilité d'une éventuelle infection exogène. Ces résultats compliquent donc l'interprétation des décomptes observés chez les groupes de souris Tg CD8 KO et Tg. Il paraît donc évident que cette expérience devra être répétée afin de confirmer ou infirmer ces observations.

En ce qui concerne l'analyse des différentes populations cellulaires du sang et des ganglions lymphatiques cervicaux (tableau III), les souris CD8 KO n'avaient effectivement pas de lymphocytes T CD8+. De plus, le nombre de lymphocytes T CD4+ des souris Tg CD8KO et des souris Tg était très similaire tant au niveau du sang qu'au niveau des ganglions lymphatiques, mais était significativement différent ($p < 0,05$) du nombre de lymphocytes T CD4+ retrouvé chez les souris CD8 KO et non-Tg. De plus, chez la souris Tg, le nombre de lymphocytes T CD8+ circulant était diminué comparativement à celui des souris non-Tg, alors qu'il était augmenté dans les ganglions des souris Tg comparativement à celui des souris non-Tg. Cette

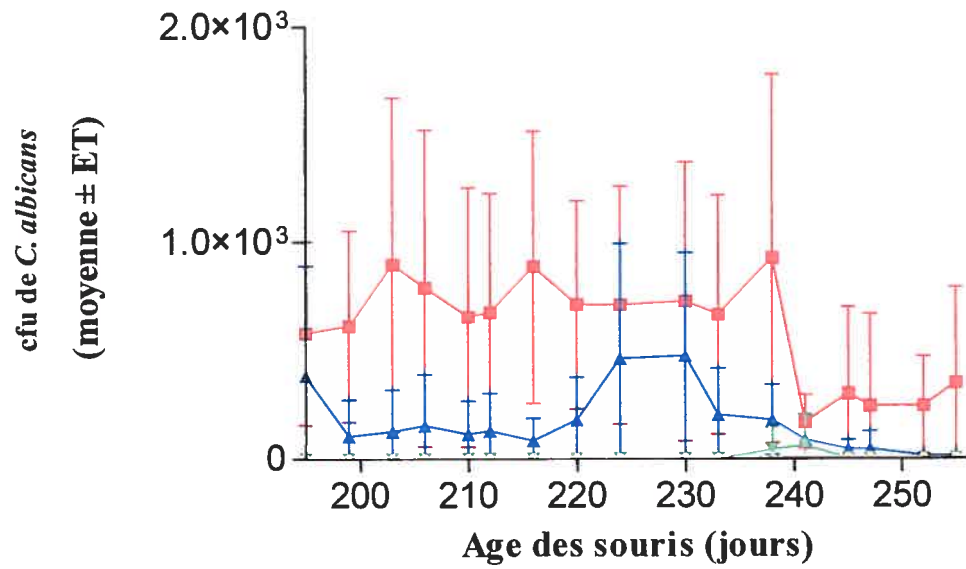
dernière observation est également constatée chez la souris CD4C/HIV^{MutA}, de même que l'intensité de la déplétion des lymphocytes T CD4+ et CD8+ (de Repentigny et al., 2002).



C)



D)



E)

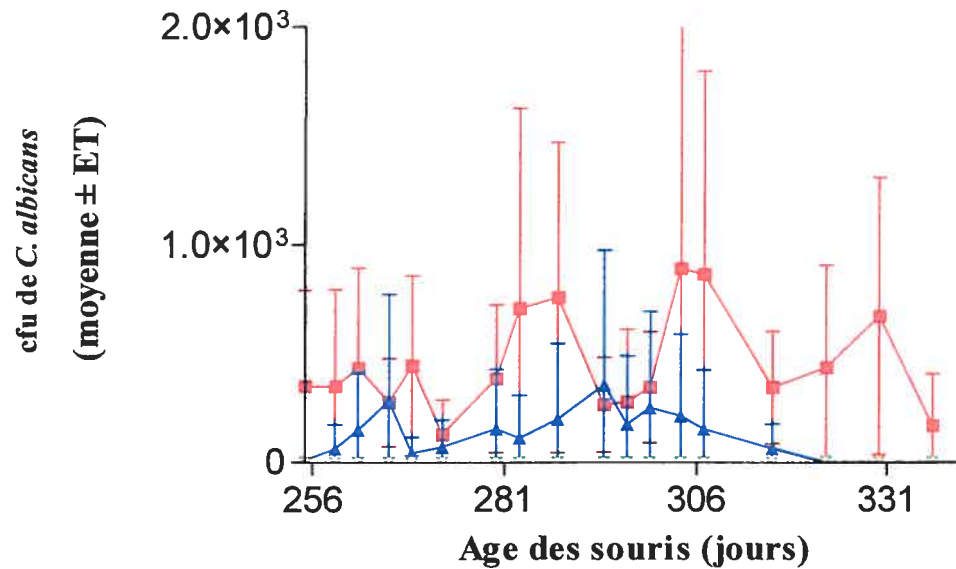


Figure 18. Décomptes buccaux de *C. albicans* retrouvés lors de la première expérience chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO (ligne rouge), chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutG} (ligne bleue), chez les souris CD8 KO (ligne verte), ainsi que chez les souris non-Tg (ligne orange) (A, B, C, D et E). Une différence significative ($p < 0,05$) a été observée entre les jours 65 et 67 au niveau des décomptes buccaux chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO comparativement aux trois autres groupes de souris à l'étude. Les résultats représentent la moyenne des cfu \pm l'écart type calculé par groupe de souris.

Tableau II. Unités de colonies viables dans les organes (cfu/gramme) des souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO, des souris Tg CD4C/HIV^{MutG}, des souris CD8 KO, ainsi que des souris non-Tg inoculées de *C. albicans* intra-oralement.

Variable	Souris ^a		
	Tg CD8 KO	Tg	Non-Tg
Nombre de souris inoculées	6	6	6
Age à l'inoculation, moyenne des jours (écart)	56 (40 - 71)	56 (40 - 71)	56 (40 - 71)
Age à l'euthanasie, moyenne des jours (écart)	227 (136 - 352) ^b	257 (172 - 352) ^c	337 (321 - 352) ^d
Culture d'organes positive pour <i>C. albicans</i>			
Cerveau			
Nombre de souris	4	2	1
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	6,8 x 10 ⁴	1,8 x 10 ³	7,4 x 10 ⁴
Écart	3,2 x 10 ² - 1,2 x 10 ⁵	1,5 x 10 ³ - 2,1 x 10 ³	2,2 x 10 ³ - 6,8 x 10 ⁴
Poumons			
Nombre de souris	0	1	1
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	NA	5,0 x 10 ³	7,7 x 10 ³
Écart	NA	NA	NA
Foie			
Nombre de souris	1	2	6
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	9,2 x 10 ³	2,2 x 10 ²	2,9 x 10 ³
Écart	NA	1,7 x 10 ² - 2,7 x 10 ²	9,3 x 10 ¹ - 1,6 x 10 ⁴

Souris ^a					
Variable	Tg CD8 KO	Tg	CD8 KO	Non-Tg	
Reins					
Nombre de souris	0	2	0	5	
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	NA	2,7 x 10 ²	NA	3,8 x 10 ³	
Écart	NA	1,1 x 10 ² – 4,4 x 10 ²	NA	4,3 x 10 ² – 1,1 x 10 ⁴	
Estomac					
Nombre de souris	4	4	0	5	
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	1,1 x 10 ⁶	1,0 x 10 ⁵	NA	6,5 x 10 ³	
Écart	8,1 x 10 ⁵ – 1,6 x 10 ⁶	7,9 x 10 ² – 4,0 x 10 ⁵	NA	8,1 x 10 ² – 2,7 x 10 ⁴	
Petit intestin					
Nombre de souris	4	4	0	6	
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	8,3 x 10 ³	2,1 x 10 ³	NA	5,6 x 10 ³	
Écart	3,3 x 10 ² – 1,5 x 10 ⁴	5,9 x 10 ¹ – 6,5 x 10 ³	NA	3,5 x 10 ² – 3,2 x 10 ⁴	
Gros intestin					
Nombre de souris	5	4	0	2	
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	9,8 x 10 ⁴	3,3 x 10 ⁴	NA	1,1 x 10 ⁴	
Écart	5,1 x 10 ³ – 2,9 x 10 ⁵	8,6 x 10 ² – 1,2 x 10 ⁵	NA	2,4 x 10 ² – 2,2 x 10 ⁴	

NOTE : NA, ne s'applique pas.

^a Les souris étudiées incluent les rejets Tg et non-Tg et CD8 KO de la souris fondatrice F27367.

^b Deux souris n'ont pas survécu jusqu'au jour 352 (souris euthanasiées les jours 136 et 193) ; les quatre autres souris ont été euthanasiées au jour 352.

^c Quatre souris n'ont pas survécu jusqu'au jour 352 (euthanasie les jours 172 à 302) ; les deux autres souris ont été euthanasiées au jour 352.

^d Toutes les souris ont survécu et elles ont été euthanasiées à l'âge de 352 jours.

Tableau III. Analyse des marqueurs de surface cellulaire des lymphocytes du sang périphérique et des ganglions lymphatiques cervicaux des souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO, des souris Tg CD4C/HIV^{MutG}, des souris CD8 KO, ainsi que des souris non-Tg inoculées intra-oralement avec *C. albicans*.

Souris ^a	Nb. inoculées	Age à l'euthanasie, moyenne des jours (écart)	Populations cellulaires, moyenne ± écart type			
			Sang périphérique		Ganglions lymphatiques cervicaux	
			CD4+	CD8+	CD4+	CD8+
CD4C/HIV ^{MutG} CD8 KO	6	227 (136 - 352)	1,5 ± 1,3 ^b	0 ^{c,d}	11,2 ± 8,3 ^b	0 ^{c,d}
CD4C/HIV ^{MutG}	6	257 (172 - 352)	1,2 ± 0,1 ^b	5,6 ± 2,3 ^b	10,1 ± 5,3 ^b	35,3 ± 8,8 ^b
CD8 KO	6	337 (321 - 352)	15,1 ± 3,9	0 ^d	62,1 ± 3,8 ^d	0 ^d
Non-Tg	6	337 (321 - 352)	16,2 ± 2,0	13,6 ± 4,6	43,0 ± 5,1	25,6 ± 2,7

^a Les souris étudiées incluent les rejets Tg et non-Tg et CD8 KO de la souris fondatrice F27367.

^b Significativement différent des souris CD8 KO et des souris non-Tg ($p < 0,05$, test ANOVA à un facteur).

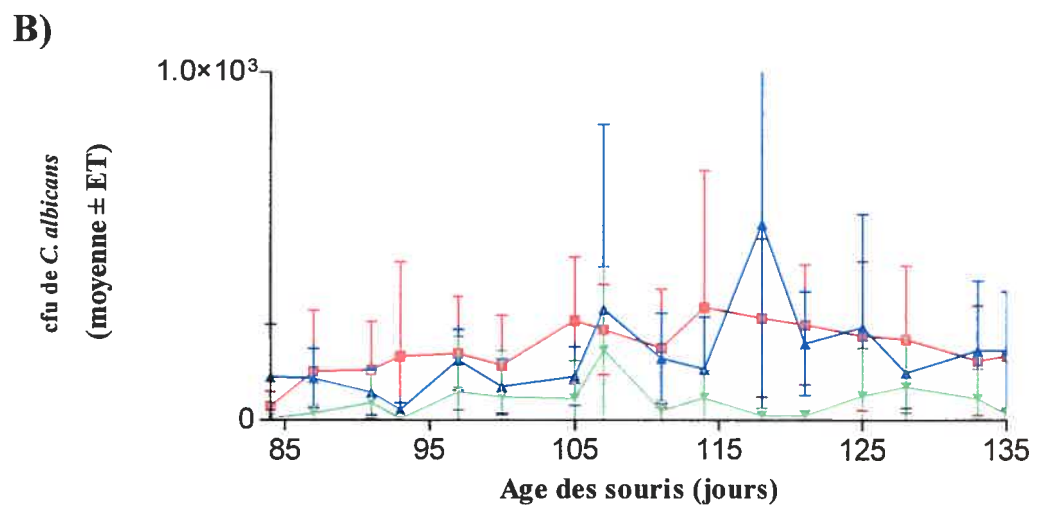
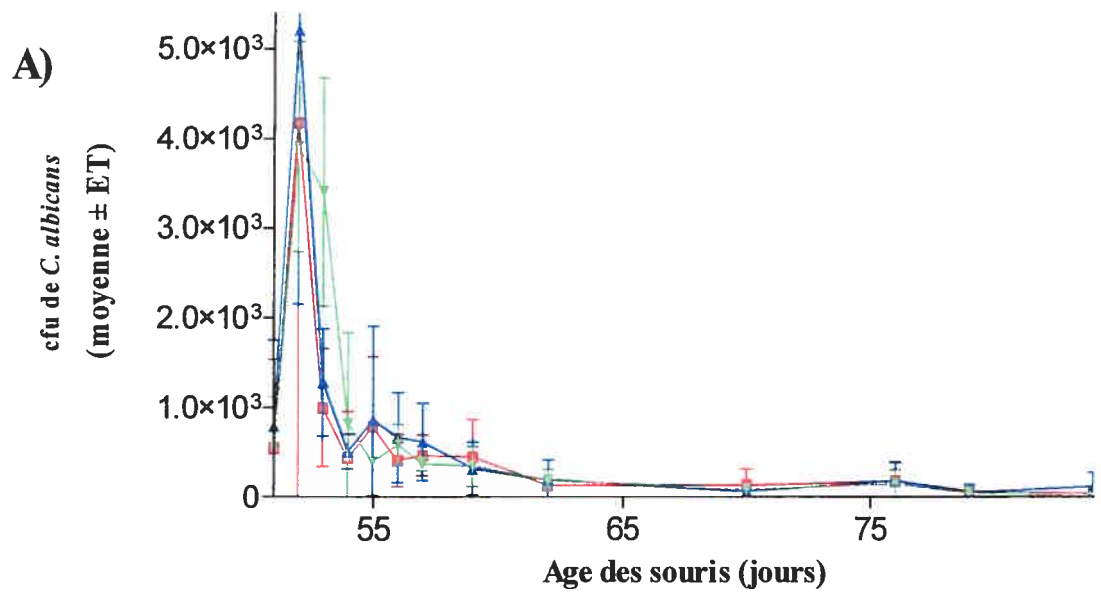
^c Significativement différent des souris CD4C/HIV^{MutG} ($p < 0,05$, test ANOVA à un facteur).

^d Significativement différent des souris non-Tg ($p < 0,05$, test ANOVA à un facteur).

Évaluation de la charge buccale de *C. albicans* chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO - Deuxième expérience. Douze souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO, sept souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO hétérozygotes et quatre souris CD4C/HIV^{MutG} ont été inoculées intra-oralement de 10^8 cfu de *C. albicans* LAM-1. Les décomptes buccaux ont été déterminés longitudinalement en procédant à des écouvillonnages de la cavité buccale.

Cette fois, suite à la primo-infection et jusqu'au jour 74, il n'y a pas eu de différence significative ($p > 0,05$) entre les souris Tg CD8 KO et les souris Tg. Toutefois, à partir du jour 78 jusqu'au dernier jour d'écouvillonnage (jour 163), les décomptes buccaux retrouvés chez les souris Tg CD8 KO ainsi que chez les souris Tg CD8 KO hétérozygotes étaient significativement plus élevés ($p < 0,05$) que ceux retrouvés chez les souris Tg. Il n'y a pas eu de différence significative ($p > 0,05$) entre les groupes de souris Tg CD8 KO homozygotes et hétérozygotes. De plus, des analyses statistiques, réalisées à partir des résultats regroupés des deux expériences, ont permis de confirmer la différence significative observée à partir du jour 78 entre les souris Tg CD8 KO et Tg. Cette expérience est présentement en cours.

Ces résultats confirment que les lymphocytes T CD8+ jouent un rôle dans la défense de l'hôte contre *C. albicans* au niveau de la muqueuse buccale chez la souris Tg.



C)

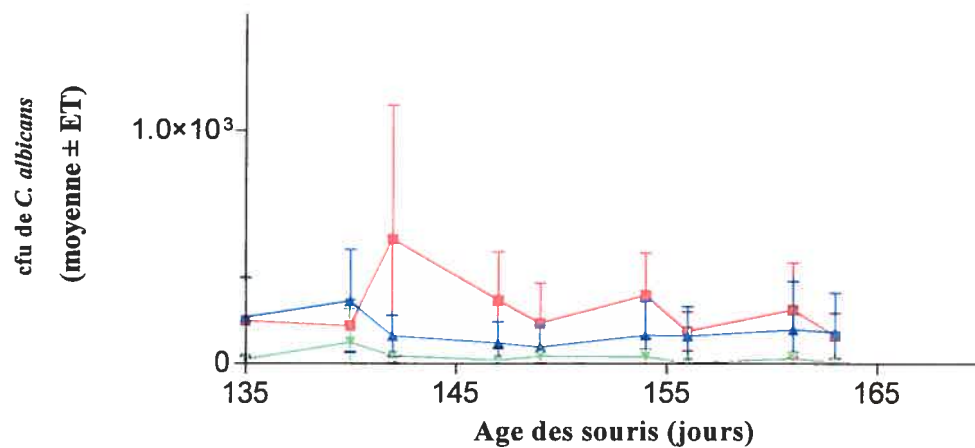


Figure 19. Décomptes buccaux de *C. albicans* recueillis lors de la deuxième expérience chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO (ligne rouge), chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO hétérozygotes (ligne bleue), ainsi que chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutG} (ligne verte) (A, B et C). À partir du jour 78, une différence significative ($p < 0,05$) est observée entre les groupes de souris Tg CD8 KO et Tg. Les résultats représentent la moyenne des cfu \pm l'écart type calculé par groupe de souris.

Évaluation de la charge buccale de *C. albicans* chez la souris Tg mCD4C/HIV^{MutG}. Pour cette expérience, quatre souris Tg mCD4C/HIV^{MutG} et deux souris non-Tg ont été inoculées intra-oralement de 10^8 cfu de *C. albicans* LAM-1. Les décomptes buccaux ont été déterminés longitudinalement en procédant à des écouvillonnages de la cavité buccale. Contrairement aux souris CD4C/HIV^{MutA} et CD4C/HIV^{MutG}, le *C. albicans* a été rapidement éliminé de la cavité buccale, et la phase de porteur chronique n'a pu être établie chez la souris mCD4C/HIV^{MutG} (figure 20). De plus, durant la primo-infection, les cfu buccaux de *C. albicans* des souris mCD4C/HIV^{MutG} n'étaient pas significativement différents ($p > 0,05$) des cfu retrouvés chez les souris non-Tg. Puisque l'expression du transgène est restreinte aux lymphocytes T CD4+, contrairement aux souris CD4C/HIV^{MutA} et CD4C/HIV^{MutG}, où le transgène est exprimé chez les lymphocytes T CD4+, les macrophages et les cellules dendritiques, ces résultats indiquent qu'une perturbation restreinte aux lymphocytes T CD4+ n'est pas suffisante pour causer une infection persistante à *C. albicans*.

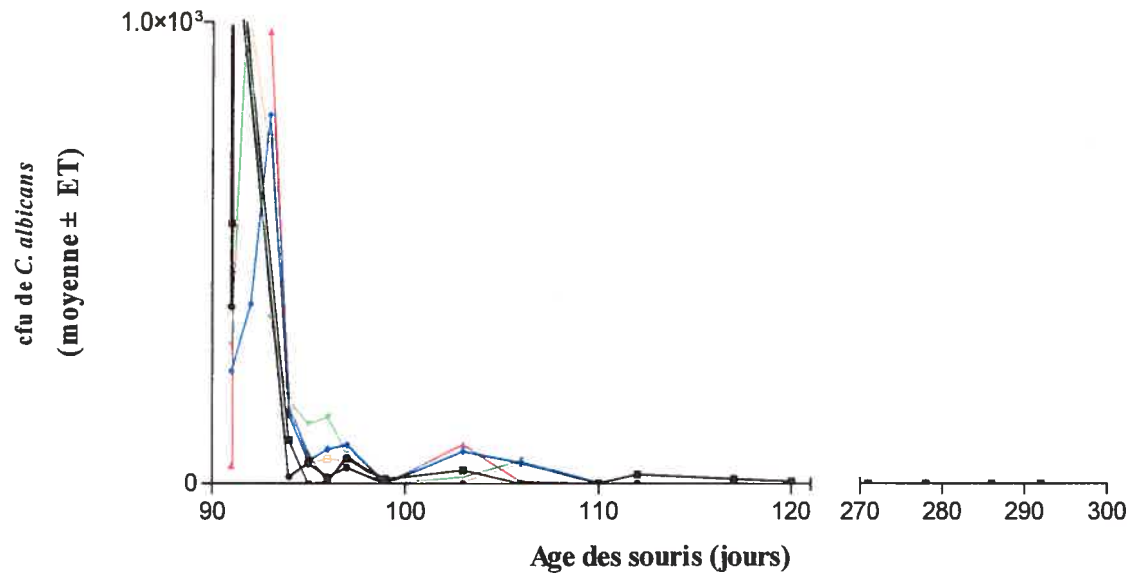


Figure 20. Décomptes buccaux chez quatre souris Tg mCD4C/HIV^{MutG} (lignes en couleur) et chez deux souris non-Tg (lignes noires) inoculées intra oralement de *C. albicans*. Chez ces souris, *C. albicans* a été éliminé aussi rapidement que chez les souris témoins non-Tg. Les résultats représentent les cfu calculés pour chaque souris, et ce jusqu'à 292 jours.

Évaluation de la charge buccale de *C. albicans* chez la souris Tg CD4E/HIV^{MutG}. Six souris Tg CD4E/HIV^{MutG} et six souris non-Tg ont été inoculées intra-oralement de 10^8 cfu de *C. albicans* LAM-1. Les décomptes buccaux ont été déterminés longitudinalement en procédant à des écouvillonnages de la cavité buccale. Tout comme chez les souris CD4C/HIV^{MutA} et CD4C/HIV^{MutG}, un état de porteur chronique de *C. albicans* fut établi chez la souris CD4E/HIV^{MutG} (figure 21). Néanmoins, l'ampleur des cfu buccaux de la souris CD4E/HIV^{MutG} était beaucoup plus faible que celle des souris CD4C/HIV^{MutA} et CD4C/HIV^{MutG}. De plus, trois souris Tg CD4E/HIV^{MutG} sur six ont réussi à éliminer le *C. albicans* après la phase d'état de porteur chronique. Puisque l'expression du transgène chez cette lignée de souris est restreinte aux lymphocytes T CD4+ et aux cellules dendritiques, comparativement aux souris CD4C/HIV^{MutA} et CD4C/HIV^{MutG} chez lesquelles le transgène est exprimé chez les lymphocytes T CD4+, les cellules dendritiques et les macrophages, ces résultats indiquent qu'une perturbation des lymphocytes T CD4+ et des cellules dendritiques est suffisante pour obtenir une infection persistante par *C. albicans*. Ces résultats suggèrent que l'expression du gène *nef* dans les lymphocytes T CD4+ et dans les cellules dendritiques, mais non dans les macrophages, est suffisante afin d'établir et de maintenir une infection buccale chronique de *C. albicans* chez ces souris Tg.

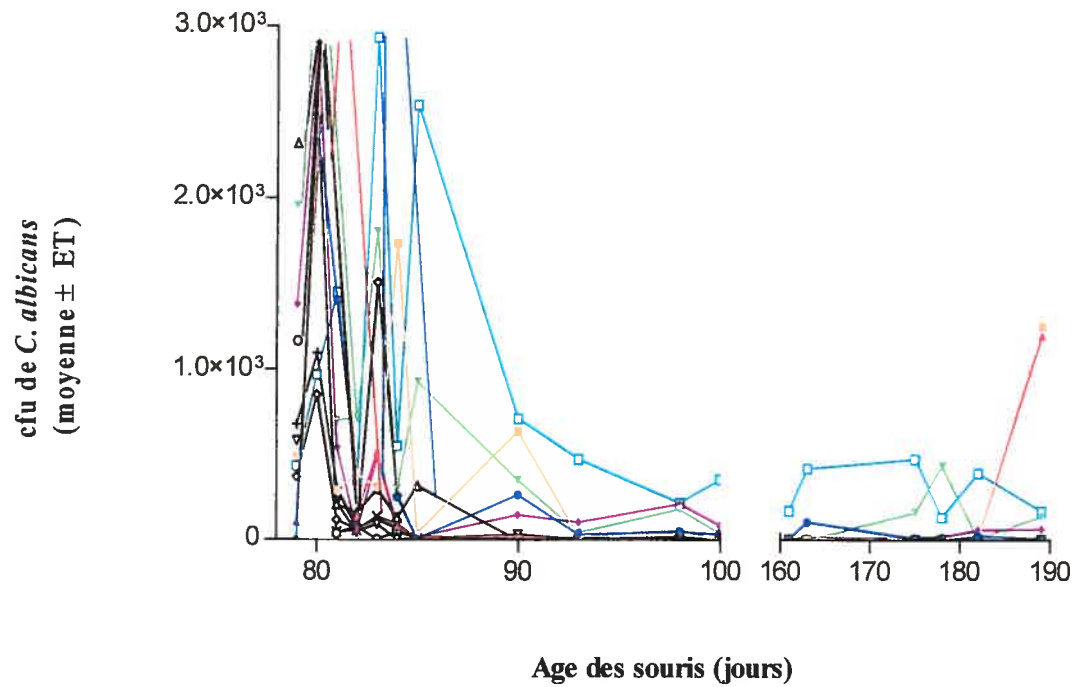


Figure 21. Décomptes buccaux chez six souris Tg CD4E/HIV^{MutG} (lignes en couleur) et chez six souris non-Tg (lignes noires) inoculées intra oralement avec *C. albicans*. Chez les souris Tg CD4E/HIV^{MutG}, un état de porteur chronique fut établi. Les résultats représentent les cfu calculés pour chaque souris, et ce jusqu'à 189 jours.

Évaluation de la dissémination systémique de *C. albicans* chez les souris Tg mCD4C/HIV^{MutG} et Tg CD4E/HIV^{MutG} (tableau IV). Tout comme chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutG}, de hauts niveaux de cfu de *C. albicans* ont été retrouvés dans l'estomac et les intestins des souris CD4E/HIV^{MutG}. Au contraire, aucune levure ne fut retrouvé chez la souris mCD4C/HIV^{MutG} ni chez la souris non-Tg. La dissémination de *C. albicans* au cerveau, aux poumons et aux reins a été retrouvée chez deux des six souris Tg CD4E/HIV^{MutG} et, de plus, dans le foie de trois des six souris Tg CD4C/HIV^{MutG}. Toutefois, la dissémination se limita à un ou deux organes seulement, à l'exception d'une seule souris Tg CD4C/HIV^{MutG} chez laquelle il y eu dissémination systémique aux quatre organes. Les décomptes de *C. albicans* dans les organes profonds des souris Tg étaient assez faibles, tel qu'observé précédemment chez la souris CD4C/HIV^{MutA} (de Repentigny, 2002).

Évaluation des populations lymphocytaires du sang et des ganglions lymphatiques cervicaux des souris Tg mCD4C/HIV^{MutG} et CD4E/HIV^{MutG} (tableau V). Chez les souris Tg CD4C/HIV^{MutG}, mCD4C/HIV^{MutG} et CD4E/HIV^{MutG} infectées à *C. albicans*, le nombre de lymphocytes T CD4⁺ était significativement abaissé ($p < 0,05$) comparativement à celui des souris non-Tg. Cette observation semble correspondre à l'expression du transgène dans les lymphocytes T CD4⁺ chez chacune de ces lignées de souris Tg, et cette diminution de lymphocytes T CD4⁺ est similaire à celle retrouvée chez les souris CD4C/HIV^{MutA} (de Repentigny, 2002). Chez les souris Tg, le nombre de lymphocytes T CD8⁺ dans le sang était abaissé comparativement à celui des souris non-Tg, contrairement aux souris mCD4C/HIV^{MutG} chez lesquelles cette population cellulaire était augmentée. Le nombre de ces cellules était augmenté dans les ganglions lymphatiques cervicaux des souris Tg, comparativement aux souris non-Tg. Cette dernière observation se retrouve également chez la souris CD4C/HIV^{MutA} (Hanna, 1998).

Déplétion des macrophages de la rate et de la muqueuse buccale à l'aide de liposomes contenant du clodronate. Afin de vérifier s'il était possible de dépléter les macrophages résidant dans la muqueuse buccale, des liposomes contenant du clodronate (L-Cl₂MDP) ont été injectés par la voie intraveineuse et par la voie intra-jugale à 3 souris non-Tg. Les deux groupes témoins, dont l'un a reçu des liposomes contenant du PBS et l'autre du PBS seulement, étaient aussi constitués de trois souris chacun. Toutes les souris ont été sacrifiées 48 heures après l'administration du traitement. La muqueuse buccale et la rate de chaque souris ont été prélevées. La rate a servi de témoin positif pour cette expérience préliminaire, car dans la littérature (van Rooijen, 1994) il est connu que l'injection de L-Cl₂MDP par la voie intraveineuse entraîne une déplétion de 50% des macrophages dans cet organe. Ensuite, les populations cellulaires obtenues ont été marquées à l'aide d'anticorps permettant d'identifier les macrophages (CD11b⁺, CD11c⁻, I-A^{k+}) et elles ont été analysées par cytométrie en flux. Une déplétion de 50% des macrophages de la rate a été obtenue chez les souris ayant reçu des L-Cl₂MDP en comparaison aux deux groupes de souris témoins (tableau VI). Ce résultat nous a permis de confirmer que ce traitement permet de dépléter les macrophages. De plus, nous avons également réussi à obtenir une déplétion de 50% des macrophages de la muqueuse buccale chez ces mêmes souris comparativement aux souris ayant reçu des L-PBS et du PBS (tableau VI). Ceci confirme que l'action du liposome seul (contenant du PBS) n'est pas suffisante pour engendrer une déplétion de ces cellules. Ce résultat représente la toute première preuve qu'il est possible de dépléter les macrophages tissulaires à l'aide de L-Cl₂MDP.

Tableau IV. Unités de colonies viables dans les organes (cfu/gramme) de souris Tg infectées intra-oralement avec *C. albicans* chez lesquelles s'exprime le transgène du VIH-1 dans des populations cellulaires définies.

Variable	Souris ^a			
	CD4C/HIV ^{MutG}	CD4E/HIV ^{MutG}	m CD4C/HIV ^{MutG}	Non-Tg
Nombre de souris inoculées	6	6	6	6
Age à l'inoculation, moyenne des jours (écart)	76	78	91	78-91
Age à l'euthanasie, moyenne des jours (écart)	293 (194 - 357) ^b	189 ^c	293 ^d	215 (189 - 293) ^e
Culture d'organes positive pour <i>C. albicans</i>				
Cerveau				
Nombre de souris	2	1	0	0
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	1,8 x 10 ³	6,9 x 10 ³	NA	NA
Écart	1,5 x 10 ³ - 2,1 x 10 ³	NA	NA	NA
Poumons				
Nombre de souris	1	1	0	1
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	4,5 x 10 ³	1,8 x 10 ³	NA	NA
Écart	NA	NA	NA	NA
Foie				
Nombre de souris	2	0	0	0
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	4,5 x 10 ²	NA	NA	NA
Écart	2,7 x 10 ² - 6,3 x 10 ²	NA	NA	NA

Souris ^a				
Variable	CD4C/HIV ^{MutG}	CD4E/HIV ^{MutG}	m CD4C/HIV ^{MutG}	Non-Tg
Reins				
Nombre de souris	2	1	0	0
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	2,8 x 10 ²	6,9 x 10 ²	NA	NA
Écart	1,1 x 10 ² –4,4 x 10 ²	NA	NA	NA
Estomac				
Nombre de souris	5	4	0	0
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	1,0 x 10 ⁵	2,3 x 10 ⁵	NA	NA
Écart	7,9 x 10 ² –4,0 x 10 ⁵	4,4 x 10 ⁴ –5,3 x 10 ⁵	NA	NA
Petit intestin				
Nombre de souris	5	6	0	0
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	2,0 x 10 ³	2,0 x 10 ⁴	NA	NA
Écart	5,9 x 10 ¹ –6,5 x 10 ³	1,2 x 10 ⁴ –3,8 x 10 ⁴	NA	NA
Gros intestin				
Nombre de souris	5	4	0	0
Comptes de <i>C. albicans</i> , moyenne cfu/g	3,4 x 10 ⁴	8,6 x 10 ⁴	NA	NA
Écart	8,5 x 10 ² –1,2 x 10 ⁵	2,8 x 10 ⁴ –1,9 x 10 ⁵	NA	NA

NOTE : NA, ne s'applique pas

^a Les souris étudiées incluent les rejets Tg et non-Tg de la souris fondatrice F27367 (CD4C/HIV^{MutG}), F104990 (CD4E/HIV^{MutG}) et F69457 (m CD4C/HIV^{MutG}).

^b Quatre souris n'ont pas survécu jusqu'au jour 357 (euthanasie les jours 194 à 338). Les deux autres souris ont été euthanasiées le jour 357.

^c Les six souris ont survécu et ont été euthanasiées à l'âge de 189 jours.

^d Les quatre souris ont survécu et ont été euthanasiées à l'âge de 293 jours.

^e Les souris non-Tg ont été euthanasiées le même jour que les souris Tg.

Tableau V. Analyse des marqueurs de surface cellulaire des lymphocytes du sang périphérique et des ganglions lymphatiques cervicaux des souris Tg infectées intra-oralement avec *C. albicans* chez lesquelles s'exprime le transgène du VIH-1 dans des populations cellulaires définies.

Souris ^a	Nb. inoculées	Age à l'euthanasie, moyenne des jours (écart)	Populations cellulaires, moyenne ± écart type			
			Sang périphérique		Ganglions lymphatiques cervicaux	
			CD4+	CD8+	CD4+	CD8+
CD4C/HIV ^{MutG}	6	293 (194 - 357)	1,2 ± 0,1 ^{b,c}	5,5 ± 2,3 ^c	10,1 ± 5,3 ^c	35,0 ± 8,8 ^c
mCD4C/HIV ^{MutG}	4	293	9,1 ± 1,3 ^c	18,6 ± 2,2 ^c	17,7 ± 1,0 ^c	38,1 ± 9,1 ^c
Non-Tg	8	347 (293 - 365)	17,1 ± 3,2	13,5 ± 3,9	43,2 ± 4,4	25,8 ± 2,5
CD4E/HIV ^{MutG}	6	189	2,2 ^d	2,4	15,3	26,4
Non-Tg	6	189	8,2	2,7	42,7	19,9

^a Les souris étudiées incluent les rejets Tg et non-Tg des souris fondatrices F27367 (CD4C/HIV^{MutG}), F104990 (CD4E/HIV^{MutG}) et F69457 (m CD4C/HIV^{MutG}).

^b Les données correspondent à la moyenne ± écart type de souris individuelles.

^c Significativement différent des souris non-Tg ($p < 0,05$, test de U de Mann-Whitney).

^d Les analyses ont été effectuées sur les populations cellulaires regroupées de six souris Tg et six souris non-Tg.

Tableau VI. Analyse des marqueurs de surface cellulaire des macrophages de la rate et de la muqueuse buccale de souris non-Tg ayant reçu des liposomes contenant du clodronate (L-Cl₂MDP) par la voie intraveineuse et par la voie intra-jugale.

Souris	Nb. inoculées	Cellules CD11b+/CD11c-/I-A ^{k+}	
		Rate	Muqueuse buccale
Non-Tg/ L-Cl ₂ MDP	3	1,3	7,0
Témoins non-Tg/L-PBS	3	2,8	14,0
Témoins non-Tg/PBS	3	2,2	14,0

DISCUSSION

Cette étude nous a permis d'approfondir les connaissances actuelles concernant les différents mécanismes immunitaires compensatoires qui participent à la défense de la muqueuse buccale de l'hôte contre la COP dans le contexte de l'infection au VIH-1. Pour ce faire, nous avons eu l'opportunité d'utiliser la souris Tg CD4C/HIV^{Mut} qui, suite à l'infection expérimentale de la muqueuse buccale par *C. albicans*, développe une candidose oropharyngée très similaire tant au niveau pathologique que clinique à celle observée chez les patients infectés au VIH. Tel que mentionné dans les sections précédentes, de nombreuses études ont permis de confirmer que les lymphocytes T CD4⁺ contribuent grandement à l'élimination de *C. albicans* dans la pathogenèse de la COP. Toutefois, en absence de cette population cellulaire, très peu ou pas de dissémination systémique aux organes profonds de *C. albicans* fut observée chez l'hôte. Il semble donc qu'il existe des mécanismes immunitaires qui compensent l'absence des lymphocytes T CD4⁺ afin de limiter la levure à la muqueuse buccale tout en l'empêchant de disséminer. Jusqu'à maintenant, plusieurs populations cellulaires ont été étudiées afin de déterminer leur potentiel fongicide à l'égard de *C. albicans* ainsi que leur contribution potentielle à la défense de l'hôte dans la pathogenèse de la COP. Les principales cellules considérées dans la présente étude comme potentiellement effectrices à l'égard de *C. albicans* chez la souris Tg sont les PMNs, les lymphocytes T CD8⁺ et les macrophages.

La déplétion des PMNs à l'aide de l'Acm RB6-8C5 chez la souris Tg, n'a ni entraîné une augmentation de la charge buccale, ni une dissémination aux organes profonds et ce, tant suite à la primo-infection que pendant la phase de porteur chronique de *C. albicans*. Deux différentes études de Jensen et al. (1993 et 1994) ont permis de démontrer que l'infection buccale de souris SCID avec *C. albicans* suivie trois semaines plus tard d'une déplétion des PMNs à l'aide de l'Acm RB6-8C5, a résulté en une augmentation de la charge buccale ainsi qu'en la dissémination systémique de *C. albicans* chez toutes les souris étudiées comparativement aux souris témoins déplétées (souris SCID et souris immunocompétentes). De plus, Cantorna et al. (1990) ont démontré que l'infection orogastrique de souris *bg/bg*

nu/nu a mené à une augmentation de la charge buccale et à la dissémination systémique de *C. albicans* chez toutes les souris comparativement aux souris témoins *bg/bg*, *nu/nu*, *bg/bg nu/+* et immunocompétentes. Finalement, la déplétion des PMNs, deux jours avant l'infection buccale à *C. albicans* chez des souris BALB/c, a permis à l'équipe de Farah et al. (2001) d'observer une augmentation de la sévérité de l'infection buccale, mais seulement aux jours 1, 4 et 6 post-traitement et non au cours des jours suivants. Dans cette dernière étude, rien n'est indiqué concernant la dissémination systémique de *C. albicans* ou la mortalité chez ces souris suite au traitement à l'aide de l'Acm. Les modèles animaux utilisés dans ces études et/ou le moment où le traitement a été administré sont probablement les deux principales causes de la discordance apparente entre nos résultats et ceux présentés ci-haut. En effet, la souris SCID a une atteinte de l'immunité humorale et de l'immunité à médiation cellulaire alors que la souris Tg CD4C/HIV^{MutA} n'a qu'une déplétion progressive des lymphocytes T CD4⁺. La déplétion des PMNs chez la souris SCID implique que seuls les macrophages et les cellules dendritiques pouvaient alors potentiellement contribuer à la défense de l'hôte contre *C. albicans*, tandis que chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutA} la majorité des populations cellulaires effectrices, bien qu'affectées à différents degrés par l'évolution de la maladie, sont encore présentes afin de contribuer à la défense de la muqueuse buccale. Il semble probable que chez la souris SCID, les deux populations cellulaires fonctionnelles ne soient pas aptes à empêcher la croissance et la dissémination du champignon en raison de l'absence de la majorité des cytokines et des molécules costimulatrices normalement nécessaires à l'activation de ces cellules en réponse à l'infection. Pour sa part, la souris *bg/bg nu/nu* a, en plus d'une atteinte au niveau des lymphocytes T (incluant les lymphocytes T CD8⁺ qui ne sont atteints qu'à la toute fin du développement de la maladie, dans notre modèle de souris), une déficience combinée des PMNs et des macrophages. Dans ce cas, il paraît évident que l'absence des deux principales populations cellulaires effectrices à l'égard de *C. albicans*, en plus d'une absence de l'immunité à médiation cellulaire soient responsables de la dissémination systémique de la levure. De plus, il semble que les kératinocytes, par la production de molécules fongicides, soient également insuffisants afin d'empêcher l'amplification de la croissance ainsi que la dissémination de *C. albicans* chez les deux modèles de souris utilisés dans les études concernant les souris SCID et les souris *bg/bg nu/nu*. De plus,

il est tout à fait possible, dans notre étude, que ce soit les deux périodes de temps où la déplétion des PMNs a été effectuée et/ou encore la durée de la neutropénie chez la souris Tg qui soient responsables de l'absence d'amplification de la candidose. En effet, Chakir et al. (1994) avaient observé une augmentation du nombre de PMNs dans la muqueuse buccale 48 heures suivant l'infection de souris immunocompétentes. Dans les jours qui suivirent, ce recrutement de PMNs à la muqueuse s'atténua et après 6 jours consécutifs d'infection, aucun PMNs ne fut observé dans la muqueuse (Chakir et al., 1994). Cette observation avait alors permis de soulever l'hypothèse que les PMNs pourraient contribuer à la défense de la muqueuse buccale dans les étapes précoces de l'infection à *C. albicans*. L'hypothèse de Chakir et al. selon laquelle les PMNs sont les premières cellules recrutées au site d'infection afin de contrôler la prolifération du pathogène, permet aussi d'expliquer l'augmentation de la charge buccale de *C. albicans*, observée par Farah et al. (2001), chez la souris BALB/c préalablement déplétée de ses PMNs. Il est donc tout à fait probable que la déplétion des PMNs, avant de procéder à l'infection buccale chez la souris BALB/c, ait entraîné l'augmentation de la charge buccale de *C. albicans*, car les autres populations cellulaires contribuant normalement à l'immunité innée n'ont pas encore eu le temps, dans ce cas, de devenir effectrices contre *C. albicans* et sont alors incapables de compenser pour la neutropénie. Dans la présente étude, la déplétion des PMNs a été effectuée à 20 ainsi qu'à 45 jours post-infection à *C. albicans*, c'est-à-dire dans des périodes de temps où aucun rôle n'a été démontré jusqu'à maintenant pour les PMNs contre *C. albicans in vivo*, puisque ces moments correspondent plutôt au développement de la défense immunitaire acquise. Il est donc possible que la déplétion des PMNs chez la souris Tg, suite à la primo-infection et dans la phase de porteur chronique, soit compensée par l'activité d'autres populations cellulaires effectrices, telles que les macrophages et/ou les lymphocytes T CD8+. De plus, il est possible qu'une neutropénie de 7 jours ne soit pas suffisamment prolongée afin d'entraîner une augmentation de la charge buccale et/ou encore la dissémination de *C. albicans* aux organes profonds chez la souris Tg. En effet, il est maintenant établi chez l'humain que suivant une neutropénie de moins de 7 jours, il n'y aura généralement pas d'administration d'antifongiques en prophylaxie chez le patient car l'incidence de la candidose disséminée d'origine endogène est alors très faible, tandis que lors d'une immunodépression prolongée, comme c'est le

cas lors d'une greffe de moelle osseuse allogénique, des antifongiques seront administrés en prophylaxie car le risque de dissémination de *C. albicans* est alors très élevée. Il est impossible, en utilisant le présent devis expérimental, d'explorer l'éventualité d'une neutropénie prolongée à cause de l'apparition d'anticorps anti-RB6-8C5 qui neutralisent l'anticorps induisant la déplétion après 7 jours consécutifs de traitement (Han et al., 1997).

En plus d'avoir démontré que les PMNs ne contribuent pas à limiter l'augmentation de la charge buccale ni à empêcher la dissémination systémiques de *C. albicans* suite à la primo-infection et pendant la phase de porteur chronique chez la souris Tg, nous avons vérifié si l'activité enzymatique des PMNs et/ou leur nombre au niveau de la circulation sanguine chez la souris Tg seraient affectés et ce, indirectement par l'expression du transgène. Nous avons donc observé que l'activité enzymatique des PMNs chez la souris Tg infectée avec *C. albicans* était augmentée, comparativement à l'activité enzymatique des souris non-Tg non-infectées et ce, suite à la primo-infection ainsi qu'à la fin de la phase de porteur chronique. Nos résultats ne concordent pas avec les études démontrant une différence entre l'activité enzymatique des PMNs isolées de patients infectés au VIH et des PMNs isolés de sujets non-infectés au VIH. En effet, aucune différence ne fut observée entre l'activité enzymatique des PMNs des souris non-Tg et des souris Tg non-infectées. L'absence de différence entre l'activité enzymatique des PMNs des souris Tg infectées et non-infectées ainsi qu'entre les souris non-Tg et Tg infectées suggère que cette augmentation résulte de l'expression du transgène combinée à l'infection à *C. albicans*. L'activité enzymatique des PMNs chez la souris Tg infectée ou non avec *C. albicans* n'est donc pas altérée par l'expression du transgène. Il est possible que l'infection persistante à *C. albicans* chez la souris Tg ait entraîné un état d'activation permanent de l'immunité et que cela ait résulté en l'activation amplifiée ou encore en la surproduction des enzymes contenues à l'intérieur des PMNs.

Le nombre de PMNs circulants est augmenté chez la souris Tg infectée et ce, tout au long de la progression de la maladie, comparativement aux trois autres groupes de souris. Cette observation ne correspond pas à la déplétion progressive des PMNs chez l'humain infecté au VIH (Aboulafia et al., 1991). Jusqu'à maintenant,

aucune équipe de chercheurs n'a pu expliquer les mécanismes qui sous-tendent cette déplétion. Il est fort probable que l'absence de production de virion chez la souris Tg soit en cause. La possibilité que l'absence de déplétion progressive des PMNs chez la souris Tg soit reliée à la mutation de plusieurs gènes du VIH-1 chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutA} est exclue, car l'augmentation du nombre de PMNs fut aussi observé chez la souris Tg CD4C/HIV^{WT} chez laquelle tous les gènes du VIH-1 étaient intacts (Hanna et al., 1998). De plus, il semble que cette augmentation ait été observée chez toutes les lignées de souris CD4C/HIV^{Mut} produites (Hanna et al., 1998).

L'augmentation de la charge buccale observée chez la souris CD4C/HIV^{MutG} CD8 KO comparativement à la souris CD4C/HIV^{MutG} représente la toute première démonstration que les lymphocytes T CD8+ participent à la défense de l'hôte contre la COP en limitant la croissance, chez la souris Tg, de *C. albicans in vivo*. L'augmentation des cfu chez la souris Tg CD8 KO se manifeste au début de la phase de porteur chronique, qui coïncide chez ces souris avec la diminution progressive du nombre de lymphocytes T CD4+, et semble se maintenir tout au long de cette phase (présentement en cours). L'absence uniquement des lymphocytes T CD8+, comme c'est le cas chez la souris CD8 KO, n'est pas suffisante pour engendrer le phénotype de la COP chez la souris immunocompétente. Il semble donc que les lymphocytes T CD8+ participent à la défense de la muqueuse buccale, dans le cas particulier où il y a une atteinte au niveau du nombre des lymphocytes T CD4+. Cette dernière constatation va de pair avec l'hypothèse de Myers et al. suggérant un rôle potentiel pour les lymphocytes T CD8+ contre la COP, après avoir observé l'accumulation de ces cellules dans la lamina propria de patients infectés au VIH et atteints de COP et ce, de façon plus marquée lors de la diminution dramatique du nombre de lymphocytes T CD4+ au cours du développement de la maladie. L'élimination de *C. albicans* au niveau de la muqueuse buccale chez la souris non-Tg et la souris CD8 KO suggère que seule l'altération combinée du nombre de lymphocytes T CD4+ engendrée par l'expression du transgène, et des lymphocytes T CD8+, est nécessaire afin qu'il y ait une augmentation de la charge de *C. albicans* au niveau de la muqueuse buccale. Par l'utilisation d'un modèle de souris *knockout* pour les lymphocytes T CD8+, nous démontrons la contribution de cette population cellulaire à la défense de l'hôte contre la COP tout au long de la progression et de l'évolution

de la maladie chez la souris Tg, comparativement aux études non-concluantes dans lesquelles des anticorps monoclonaux anti-CD4 et anti-CD8 furent administrés sans succès à des souris immunocompétentes. L'absence de différence entre les décomptes buccaux retrouvés chez la souris Tg CD8 KO et la souris Tg CD8 KO hétérozygote permet de cerner un peu plus le rôle exact des lymphocytes T CD8+. En effet, il a été démontré par Fung-Leung et al. (1991) que chez la souris hétérozygote non-Tg (un seul des deux allèles de la chaîne α du récepteur CD8 est muté) le nombre de récepteurs CD8 est diminué de moitié. Toutefois, des études fonctionnelles des lymphocytes T CD8+ provenant de ces souris ont permis de démontrer que l'activité cytotoxique de ces cellules est comparable à celle provenant des souris témoins normales (Fung-Leung et al., 1991). Selon nos résultats, il semblerait donc que la diminution du nombre de récepteurs CD8 chez la souris Tg CD8 KO hétérozygote soit suffisante pour causer l'amplification de la charge buccale chez la souris Tg. L'interaction entre le complexe du CMH de classe I : peptide antigénique et le complexe TCR $\alpha\beta$: CD3 accompagné récepteur CD8 présent sur la cellule T est responsable de la différenciation des lymphocytes T CD8+ naïfs en CTL. Ensuite, soit le CTL tuera directement le pathogène, ou il contribuera indirectement à l'élimination du pathogène en sécrétant des cytokines essentielles à l'activation des autres populations cellulaires effectrices. Dans le cas où les CTL joueraient un rôle direct dans la COP serait-il plus probable : (i) d'observer un phénotype candidose intermédiaire à celui de la souris Tg et de la souris Tg CD8 KO et ce, en partie à cause de l'activité cytotoxique normale de ces cellules ou alors (ii) qu'un niveau basal du nombre de CTL fonctionnels permettraient une réponse cytotoxique normale et complète qui, lorsque franchi, aurait pour conséquence l'inefficacité des CTL résiduels à maîtriser la prolifération de *C. albicans*. Dans ce dernier cas, on observerait alors le même phénotype de candidose que celui retrouvé chez les souris Tg CD8 KO. Malgré les études de Beno et al. (1995) démontrant le rôle cytotoxique direct des lymphocytes T CD8+ à l'égard de *C. albicans in vitro*, les observations de Myers et al. (2003) supportent l'hypothèse que les CTL joueraient plutôt un rôle indirect dans la pathogenèse de la COP et ce, à cause de la distance éloignée entre le *C. albicans* à la surface de la muqueuse buccale et les CTL accumulés à l'interface de la lamina propria et de la couche basale de l'épithélium. Il est donc plus probable que l'augmentation des cfu observée tant chez la souris Tg

CD8 KO que la Tg CD8 KO hétérozygote soit le résultat de l'incapacité des cellules effectrices, telles les macrophages, à contrôler l'infection en absence des cytokines activatrices normalement sécrétées par les CTL.

Plusieurs méthodes ont été utilisées jusqu'à maintenant afin de vérifier l'implication des macrophages dans certains phénomènes biologiques en les déplaçant *in vivo*. Ces méthodes de déplétion des macrophages étaient basées sur l'administration de certains produits tels que la silice, les particules de carbone, la carrageenane et l'acide polyinosinique : polycytidylique (poly[I·C]). Toutefois, certains de ces produits tels la silice, les particules de carbone et la carrageenane n'agissent pas uniquement sur les macrophages, n'induisent pas de déplétion complète de cette population cellulaire et ne permettent pas de cibler spécifiquement la déplétion des macrophages à un organe en particulier (van Rooijen et al., 1997). De plus, certaines études ont permis de démontrer que la carrageenane ainsi que le poly[I·C] activent les macrophages directement à produire des cytokines tel que l'IFN- γ , ainsi que le NO (van Rooijen et al., 1997 ; Jensen et al., 1992). Évidemment, l'hétérogénéité de la population macrophagique constitue le principal obstacle à l'obtention d'une déplétion totale de ces cellules et de plus, en raison de l'absence d'un récepteur ou d'une molécule de surface spécifique au macrophage, la production de souris *knockout* pour la population des monocytes/macrophages est impossible jusqu'à maintenant. L'utilisation de liposomes contenant du clodronate constitue un choix judicieux afin de répondre à nos hypothèses concernant l'implication des macrophages chez la souris Tg dans la défense de l'hôte contre la COP. Les liposomes sont de petites vésicules lipidiques qui une fois administrées à l'hôte, ne peuvent être éliminées que par la phagocytose. En effet, c'est seulement une fois à l'intérieur du phagolysosome du macrophage que le liposome sera dégradé et que le clodronate contenu à l'intérieur du liposome sera relâché afin d'induire l'apoptose de la cellule cible. Un autre avantage de l'utilisation des liposomes contenant du clodronate s'avère la très courte demie-vie (quelques secondes) du clodronate à l'intérieur de la circulation sanguine et des fluides corporels (van Rooijen et al., 1997). De plus, à l'état libre, le clodronate ne traverse ni ne diffuse à travers la membrane plasmique des cellules. Il a été démontré que les PMNs (Qian et al., 1994), les cellules dendritiques (van Rooijen et al., 1989) et les autres cellules

non-phagocytaires ne sont nullement affectés par l'activité des liposomes contenant du clodronate (Claassen et al., 1990). L'administration de liposomes contenant du clodronate offre la possibilité de dépleter sélectivement les macrophages d'un organe en particulier. En effet, jusqu'à maintenant, il a été démontré que l'administration de liposomes contenant du clodronate par la voie intraveineuse et par la voie intrapéritonéale entraînent la déplétion des macrophages de la rate et du foie (van Rooijen et al., 1989 et 1990) ; que par la voie sous-cutanée ce sont les macrophages des ganglions lymphatiques qui sont déplétés (Delemarre et al., 1990) ; que par la voie intra-trachéale, ce sont les macrophages alvéolaires qui sont déplétés (Thepen et al., 1989) de même que, par injection locale au niveau des testicules, les macrophages testiculaires sont déplétés (Bergh et al., 1993). Une limitation de cette méthode est que les liposomes doivent se rendre physiquement aux macrophages afin d'induire leur déplétion. Donc, ils sont incapables de traverser les parois des capillaires sanguins ainsi que les tissus trop denses afin de dépleter les macrophages situés plus profondément à l'intérieur d'un organe comme c'est le cas pour les macrophages spléniques qui ne peuvent être déplétés qu'à 50% à cause de l'inaccessibilité de certaines sous-populations de macrophages au sein de la rate. Dans cette étude, nous avons réussi à démontrer pour la toute première fois qu'il est possible de dépleter spécifiquement les macrophages résidant dans les muqueuses buccales de souris, par injection intra-jugale de liposomes contenant du clodronate. Ainsi il sera possible de vérifier si la déplétion des macrophages chez la souris Tg entraînera ou non l'augmentation de la charge buccale et/ou la dissémination systémique de *C. albicans*. Il sera important toutefois de s'assurer que la déplétion optimale au niveau de la muqueuse buccale correspond à seulement la moitié des macrophages.

Les résultats obtenus à l'aide des souris Tg mCD4C/HIV^{MutG} et des souris Tg CD4E/HIV^{MutG} nous permettent, a priori, d'émettre l'hypothèse que les macrophages semblent être, en partie responsables de l'élimination de *C. albicans* au niveau de la muqueuse buccale chez la souris Tg. En effet, le *C. albicans* a été complètement éliminé de la muqueuse buccale de la souris Tg mCD4C chez qui le transgène s'exprimait seulement chez les lymphocytes T CD4+, alors que le phénotype de la candidose oropharyngée n'a été observé que chez la moitié des souris Tg CD4E chez

qui le transgène s'exprime chez les lymphocytes T CD4⁺ et chez les cellules dendritiques, mais pas chez les macrophages. Ces résultats indiquent que l'expression du transgène dans les macrophages est requise afin d'obtenir une candidose oropharyngée chez toutes les souris, mais que l'expression du transgène uniquement dans les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4⁺ est suffisante et nécessaire afin d'obtenir le phénotype de la candidose oropharyngée. Chez la souris Tg CD4E, dans le cas où l'expression du transgène altérerait, chez la cellule dendritique, la production des cytokines activatrices, il est aussi possible que l'expression du transgène ait entraîné indirectement l'altération des fonctions effectrices des macrophages résultant en l'apparition du phénotype. Evidemment, seules les études de déplétion des macrophages permettront de répondre hors de tout doute à ces questions.

Les perspectives pour ce projet de recherche sont nombreuses. En ce qui concerne les PMNs des souris Tg, il sera intéressant de vérifier si la phagocytose et l'activité fongicide de ces cellules sont altérées ou non alors que l'on sait maintenant que leur activité enzymatique est normale. Récemment, nous avons effectué la déplétion des PMNs à 70 jours post-infection à *C. albicans* (résultats non-présentés). Ces résultats confirment que les PMNs ne jouent aucun rôle dans la pathogenèse de la COP dans le cas d'une déplétion de relativement courte durée et ce, pour les trois temps étudiés. De plus, il sera intéressant de vérifier si le phénotype buccal des souris Tg CD8 KO se maintient dans les étapes plus tardives du développement de la maladie, ainsi que l'apparition ou non de dissémination systémique chez ces souris. La réalisation d'un transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺ chez la souris Tg CD8 KO sera nécessaire afin de renverser l'augmentation des cfu de la cavité buccale que l'on a observé chez ces souris comparativement aux souris Tg CD4C/HIV^{MutG}. Chez les souris Tg, il sera pertinent de vérifier si la production d'IFN- γ est altérée ou non chez les lymphocytes T CD8⁺ ainsi que d'administrer cette même cytokine aux souris Tg CD8 KO afin de vérifier si la charge buccale de *C. albicans* demeurera la même, permettant ainsi de déterminer si les lymphocytes T CD8⁺ jouent principalement un rôle direct ou indirect dans la pathogenèse de la COP. Les macrophages devront être déplétés chez la souris Tg à l'aide des liposomes contenant du clodronate et ce, aux mêmes moments que ceux étudiés pour la déplétion des

PMNs afin de vérifier si la déplétion des macrophages entraîne ou non l'augmentation de la charge buccale et/ou une dissémination systémique de *C. albicans* chez la souris Tg. Finalement, des analyses fonctionnelles complètes des macrophages devront être effectuées afin de vérifier si l'expression directe du transgène dans ces cellules altère ou non la flambée oxydative, la production de NO, la phagocytose et l'activité fongicide contre *C. albicans*.

RÉFÉRENCES

- Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Cellular and molecular immunology, Fourth edition. 2000.
- Aboulafia DM, Mitsuyasu RT. Hematologic abnormalities in AIDS. *Hematol Oncol Clin North Am* 1991 Apr; 5 (2) :195-214.
- Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B, Idali F, Lindbom L, et al. The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 2000 Nov;96(9):3086-93.
- Aljurf M, Ezzat A, O Musa M. Emerging role of gammadelta T-cells in health and disease. *Blood Rev* 2002 Dec;16 (4):203-6.
- Anderson J, Cundiff L, Schnars B, Gao MX, Mackenzie I, Soll DR. Hypha formation in the white-opaque transition of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1989 Feb;57(2):458-67.
- Anderson SJ, Lenburg M, Landau NR, Garcia JV. The cytoplasmic domain of CD4 is sufficient for its down-regulation from the cell surface by human immunodeficiency virus type 1 Nef. *J Virol* 1994 May;68(5):3092-101.
- Ansel J, Perry P, Brown J, Damm D, Phan T, Hart C, et al. Cytokine modulation of keratinocyte cytokines. *J Invest Dermatol* 1990 Jun;94(6 Suppl):101S-7S.
- Arancia G, Molinari A, Crateri P, Stringaro A, Ramoni C, Dupuis ML, et al. Noninhibitory binding of human interleukin-2-activated natural killer cells to the germ tube forms of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995 Jan;63(1):280-8.
- Arribas JR, Hernandez-Albujar S, Gonzalez-Garcia JJ, Pena JM, Gonzalez A, Canedo T, et al. Impact of protease inhibitor therapy on HIV-related oropharyngeal candidiasis. *AIDS* 2000 May;14(8):979-85.
- Ashman RB, Papadimitriou JM. Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection. *Microbiol Rev* 1995 Dec;59(4):646-72.
- Ashman RB, Papadimitriou JM. Susceptibility of beige mutant mice to candidiasis may be linked to a defect in granulocyte production by bone marrow stem cells. *Infect Immun* 1991 Jun;59(6):2140-6.
- Ashman RB, Papadimitriou JM, Fulurija A, Drysdale KE, Farah CS, Naidoo O, et al. Role of complement C5 and T lymphocytes in pathogenesis of disseminated and mucosal candidiasis in susceptible DBA/2 mice. *Microb Pathog* 2003 Feb;34(2):103-13.

- Atkinson JC, Yeh C, Oppenheim FG, Bermudez D, Baum BJ, Fox PC. Elevation of salivary antimicrobial proteins following HIV-1 infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1990;3(1):41-8.
- Balan I, Alarco AM, Raymond M. The *Candida albicans* CDR3 gene codes for an opaque-phase ABC transporter. *J Bacteriol* 1997 Dec;179(23):7210-8.
- Balish E, Balish MJ, Salkowski CA, Lee KW, Bartizal KF. Colonization of congenitally athymic, gnotobiotic mice by *Candida albicans*. *Appl Environ Microbiol* 1984 Apr;47(4):647-52.
- Balish E, Vazquez-Torres FA, Jones-Carson J, Wagner RD, Warner T. Importance of beta2-microglobulin in murine resistance to mucosal and systemic candidiasis. *Infect Immun* 1996 Dec;64(12):5092-7.
- Balish E, Wagner RD, Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Pierson C, Warner T. Mucosal and systemic candidiasis in IL-8Rh^{-/-} BALB/c mice. *J Leukoc Biol* 1999 Jul;66(1):144-50.
- Balish E, Wagner RD, Vazquez-Torres A, Pierson C, Warner T. Candidiasis in interferon-gamma knockout (IFN-gamma^{-/-}) mice. *J Infect Dis* 1998 Aug;178(2):478-87.
- Balish E, Warner T, Pierson CJ, Bock DM, Wagner RD. Oropharyngeal candidiasis is lethal for transgenic mice with combined natural killer and T-cell defects. *Med Mycol* 2001 Jun;39(3):261-8.
- Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998 Mar;392(6673):245-52.
- Bandres JC, Trial J, Musher DM, Rossen RD. Increased phagocytosis and generation of reactive oxygen products by neutrophils and monocytes of men with stage 1 human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1993 Jul;168(1):75-83.
- Barr CE, Miller LK, Lopez MR, Croxson TS, Schwartz SA, Denman H, et al. Recovery of infectious HIV-1 from whole saliva. *J Am Dent Assoc* 1992 Feb;123(2):36-7, 39-48; discussion 38.
- Barron MA, Blyveis N, Palmer BE, MaWhinney S, Wilson CC. Influence of plasma viremia on defects in number and immunophenotype of blood dendritic cell subsets in human immunodeficiency virus 1-infected individuals. *J Infect Dis* 2003 Jan;187(1):26-37.
- Beno DW, Mathews HL. Growth inhibition of *Candida albicans* by interleukin-2-induced lymph node cells. *Cell Immunol* 1990 Jun;128(1):89-100.
- Beno DW, Stover AG, Mathews HL. Growth inhibition of *Candida albicans* hyphae by CD8⁺ lymphocytes. *J Immunol* 1995 May;154(10):5273-81.

- Bergh A, Damber JE, van Rooijen N. Liposome-mediated macrophage depletion: an experimental approach to study the role of testicular macrophages in the rat. *J Endocrinol* 1993 Mar;136(3):407-13.
- Bhatia V, Kochhar R, Talwar P, Gupta NM, Mehta SK. Association of *Candida* with carcinoma of esophagus. *Indian J Gastroenterol* 1989 Jul;8(3):171-2.
- Bikandi J, Moragues MD, Quindos G, Polonelli L, Ponton J. Influence of environmental pH on the reactivity of *Candida albicans* with salivary IgA. *J Dent Res* 2000 Jun;79(6):1439-42.
- Biron CA, Nguyen KB, Pien GC, Cousens LP, Salazar-Mather TP. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu Rev Immunol* 1999;17:189-220.
- Bodey GP, Buckley M, Sathe YS, Freireich EJ. Quantitative relationships between circulating leukocytes and infection in patients with acute leukemia. *Ann Intern Med* 1966 Feb;64(2):328-40.
- Boman HG. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annu Rev Immunol* 1995;13:61-92.
- Bonacini M, Young T, Laine L. The causes of esophageal symptoms in human immunodeficiency virus infection. A prospective study of 110 patients. *Arch Intern Med* 1991 Aug;151(8):1567-72.
- Brady HJ, Pennington DJ, Dzierzak EA. Transgenic mice as models of human immunodeficiency virus expression and related cellular effects. *J Gen Virol* 1994 Oct;75 (Pt 10):2549-58.
- Brandtzaeg P, Dale I, Fagerhol MK. Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia. *Am J Clin Pathol* 1987 Jun;87(6):700-7.
- Calderone RA. *Candida* and Candidiasis. 2002.
- Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends Microbiol* 2001 Jul;9(7):327-35.
- Cantorna MT, Balish E. Mucosal and systemic candidiasis in congenitally immunodeficient mice. *Infect Immun* 1990 Apr;58(4):1093-100.
- Cantorna MT, Balish E. Role of CD4+ lymphocytes in resistance to mucosal candidiasis. *Infect Immun* 1991 Jul;59(7):2447-55.
- Cassatella MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv Immunol* 1999;73:369-509.

- Cauda R, Tacconelli E, Tumbarello M, Morace G, De Bernardis F, Torosantucci A, et al. Role of protease inhibitors in preventing recurrent oral candidosis in patients with HIV infection: a prospective case-control study. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1999 May;21(1):20-5.
- Cenci E, Mencacci A, Del Sero G, d'Ostiani CF, Mosci P, Bacci A, et al. IFN-gamma is required for IL-12 responsiveness in mice with *Candida albicans* infection. *J Immunol* 1998 Oct;161(7):3543-50.
- Cenci E, Romani L, Mencacci A, Spaccapelo R, Schiaffella E, Puccetti P, et al. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur J Immunol* 1993 May;23(5):1034-8.
- Chaffin WL, Lopez-Ribot JL, Casanova M, Gozalbo D, Martinez JP. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998 Mar;62(1):130-80.
- Chakir J, Cote L, Coulombe C, Deslauriers N. Differential pattern of infection and immune response during experimental oral candidiasis in BALB/c and DBA/2 (H-2d) mice. *Oral Microbiol Immunol* 1994 Apr;9(2):88-94.
- Challacombe SJ, Sweet SP. Salivary and mucosal immune responses to HIV and its co-pathogens. *Oral Dis* 1997 May;3 Suppl 1:S79-84.
- Charton-Bain MC, Terris B, Dauge MC, Marche C, Walker F, Bouchaud O, et al. Reduced number of Langerhans cells in oesophageal mucosa from AIDS patients. *Histopathology* 1999 May;34(5):399-404.
- Chen TP, Roberts RL, Wu KG, Ank BJ, Stiehm ER. Decreased superoxide anion and hydrogen peroxide production by neutrophils and monocytes in human immunodeficiency virus-infected children and adults. *Pediatr Res* 1993 Oct;34(4):544-50.
- Chou LL, Epstein J, Cassol SA, West DM, He W, Firth JD. Oral mucosal Langerhans' cells as target, effector and vector in HIV infection. *J Oral Pathol Med* 2000 Sep;29(8):394-402.
- Cilla G, Perez Trallero E, Furundarena JR, Cuadrado E, Iribarren JA, Neira F. Esophageal candidiasis and immunodeficiency associated with acute HIV infection. *AIDS* 1988 Oct;2(5):399-400.
- Claassen I, Van Rooijen N, Claassen E. A new method for removal of mononuclear phagocytes from heterogeneous cell populations in vitro, using the liposome-mediated macrophage 'suicide' technique. *J Immunol Methods* 1990 Dec;134(2):153-61.
- Classification and diagnostic criteria for oral lesions in HIV infection. EC-Clearinghouse on Oral Problems Related to HIV Infection and WHO Collaborating Centre on Oral Manifestations of the Immunodeficiency Virus. *J Oral Pathol Med* 1993 Aug;22(7):289-91.

- Clerici M, Shearer GM. A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunol Today* 1993 Mar;14(3):107-11.
- Coates RA, Farewell VT, Raboud J, Read SE, Klein M, MacFadden DK, et al. Using serial observations to identify predictors of progression to AIDS in the Toronto Sexual Contact Study. *J Clin Epidemiol* 1992 Mar;45(3):245-53.
- Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. *Science* 1995 Dec;270(5243):1811-5.
- Colasante A, Rosini S, Piattelli A, Artese L, Aiello FB, Musiani P. Distribution and phenotype of immune cells in normal human gingiva: active immune response versus unresponsiveness. *J Oral Pathol Med* 1992 Jan;21(1):12-6.
- Cole GT, Halawa AA, Anaissie EJ. The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside. *Clin Infect Dis* 1996 May;22 Suppl 2:S73-88.
- Conlan JW, North RJ. Neutrophils are essential for early anti-Listeria defense in the liver, but not in the spleen or peritoneal cavity, as revealed by a granulocyte-depleting monoclonal antibody. *J Exp Med* 1994 Jan;179(1):259-68.
- Coxon A, Tang T, Mayadas TN. Cytokine-activated endothelial cells delay neutrophil apoptosis in vitro and in vivo. A role for granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med* 1999 Oct;190(7):923-34.
- Crowe SM, Vardaxis NJ, Kent SJ, Maerz AL, Hewish MJ, McGrath MS, et al. HIV infection of monocyte-derived macrophages in vitro reduces phagocytosis of *Candida albicans*. *J Leukoc Biol* 1994 Sep;56(3):318-27.
- Cullell-Young M, Barrachina M, Lopez-Lopez C, Gonalons E, Lloberas J, Soler C, et al. From transcription to cell surface expression, the induction of MHC class II I-A alpha by interferon-gamma in macrophages is regulated at different levels. *Immunogenetics* 2001 Mar;53(2):136-44.
- De Bernardis F, Arancia S, Morelli L, Hube B, Sanglard D, Schafer W, et al. Evidence that members of the secretory aspartyl proteinase gene family, in particular SAP2, are virulence factors for *Candida vaginitis*. *J Infect Dis* 1999 Jan;179(1):201-8.
- De Bernardis F, Muhlschlegel FA, Cassone A, Fonzi WA. The pH of the host niche controls gene expression in and virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1998 Jul;66(7):3317-25.
- de Repentigny L, Aumont F, Ripeau JS, Fiorillo M, Kay DG, Hanna Z, et al. Mucosal candidiasis in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1. *J Infect Dis* 2002 Apr;185(8):1103-14.

- Delemarre FG, Kors N, van Rooijen N. Elimination of spleen and of lymph node macrophages and its difference in the effect on the immune response to particulate antigens. *Immunobiology* 1990 Dec;182(1):70-8.
- Deslauriers N, Cote L, Montplaisir S, de Repentigny L. Oral carriage of *Candida albicans* in murine AIDS. *Infect Immun* 1997 Feb;65(2):661-7.
- Detels R, Tarwater P, Phair JP, Margolick J, Riddler SA, Munoz A. Effectiveness of potent antiretroviral therapies on the incidence of opportunistic infections before and after AIDS diagnosis. *AIDS* 2001 Feb;15(3):347-55.
- Diamond RD, Clark RA, Haudenschild CC. Damage to *Candida albicans* hyphae and pseudohyphae by the myeloperoxidase system and oxidative products of neutrophil metabolism in vitro. *J Clin Invest* 1980 Nov;66(5):908-17.
- Dieu-Nosjean MC, Massacrier C, Homey B, Vanbervliet B, Pin JJ, Vicari A, et al. Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. *J Exp Med* 2000 Sep;192(5):705-18.
- Djeu JY, Matsushima K, Oppenheim JJ, Shiotsuki K, Blanchard DK. Functional activation of human neutrophils by recombinant monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/IL-8. *J Immunol* 1990 Mar;144(6):2205-10.
- Dongari-Bagtzoglou A, Kashleva H. *Candida albicans* triggers interleukin-8 secretion by oral epithelial cells. *Microb Pathog* 2003 Apr;34(4):169-77.
- Dukes CS, Yu Y, Rivadeneira ED, Sauls DL, Liao HX, Haynes BF, et al. Cellular CD44S as a determinant of human immunodeficiency virus type 1 infection and cellular tropism. *J Virol* 1995 Jul;69(7):4000-5.
- Duncan RA, von Reyn CF, Alliegro GM, Toossi Z, Sugar AM, Levitz SM. Idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia--four patients with opportunistic infections and no evidence of HIV infection. *N Engl J Med* 1993 Feb;328(6):393-8.
- Duval M, Yotnda P, Bensussan A, Oudhiri N, Guidal C, Rohrllich P, et al. Potential antileukemic effect of gamma delta T cells in acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 1995 May;9(5):863-8.
- Ebner S, Lenz A, Reider D, Fritsch P, Schuler G, Romani N. Expression of maturation-/migration-related molecules on human dendritic cells from blood and skin. *Immunobiology* 1998 Mar;198(5):568-87.
- Eckmann L, Kagnoff MF, Fierer J. Epithelial cells secrete the chemokine interleukin-8 in response to bacterial entry. *Infect Immun* 1993 Nov;61(11):4569-74.
- Edgerton M, Scannapieco FA, Reddy MS, Levine MJ. Human submandibular-sublingual saliva promotes adhesion of *Candida albicans* to polymethylmethacrylate. *Infect Immun* 1993 Jun;61(6):2644-52.

- Elahi S, Pang G, Ashman RB, Clancy R. Nitric oxide-enhanced resistance to oral candidiasis. *Immunology* 2001 Dec;104(4):447-54.
- Elahi S, Pang G, Clancy R, Ashman RB. Cellular and cytokine correlates of mucosal protection in murine model of oral candidiasis. *Infect Immun* 2000 Oct;68(10):5771-7.
- Ellis M, Gupta S, Galant S, Hakim S, VandeVen C, Toy C, et al. Impaired neutrophil function in patients with AIDS or AIDS-related complex: a comprehensive evaluation. *J Infect Dis* 1988 Dec;158(6):1268-76.
- Ensslin AS, Formby B. Comparison of cytolytic and proliferative activities of human gamma delta and alpha beta T cells from peripheral blood against various human tumor cell lines. *J Natl Cancer Inst* 1991 Nov;83(21):1564-9.
- Epstein JB, Kimura LH, Menard TW, Truelove EL, Pearsall NN. Effects of specific antibodies on the interaction between the fungus *Candida albicans* and human oral mucosa. *Arch Oral Biol* 1982;27(6):469-74.
- Eversole LR, Miyasaki KT, Christensen RE. Keratinocyte expression of calprotectin in oral inflammatory mucosal diseases. *J Oral Pathol Med* 1993 Aug;22(7):303-7.
- Eversole LR, Reichart PA, Ficarra G, Schmidt-Westhausen A, Romagnoli P, Pimpinelli N. Oral keratinocyte immune responses in HIV-associated candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997 Oct;84(4):372-80.
- Farah CS, Elahi S, Drysdale K, Pang G, Gotjamanos T, Seymour GJ, et al. Primary role for CD4(+) T lymphocytes in recovery from oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* 2002a Feb;70(2):724-31.
- Farah CS, Elahi S, Pang G, Gotjamanos T, Seymour GJ, Clancy RL, et al. T cells augment monocyte and neutrophil function in host resistance against oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* 2001a Oct;69(10):6110-8.
- Farah CS, Gotjamanos T, Seymour GJ, Ashman RB. Cytokines in the oral mucosa of mice infected with *Candida albicans*. *Oral Microbiol Immunol* 2002b Dec;17(6):375-8.
- Farah CS, Hong S, Wanasaengsakul S, Elahi S, Pang G, Gotjamanos T, et al. Irradiation-induced oral candidiasis in an experimental murine model. *Oral Microbiol Immunol* 2001b Dec;16(6):358-63.
- Fauci AS, Pantaleo G, Stanley S, Weissman D. Immunopathogenic mechanisms of HIV infection. *Ann Intern Med* 1996 Apr;124(7):654-63.
- Fazio RA, Wickremesinghe PC, Arsura EL. Ketoconazole treatment of *Candida* esophagitis--a prospective study of 12 cases. *Am J Gastroenterol* 1983 May;78(5):261-4.

- Feigal DW, Katz MH, Greenspan D, Westenhouse J, Winkelstein W Jr, Lang W, et al. The prevalence of oral lesions in HIV-infected homosexual and bisexual men: three San Francisco epidemiological cohorts. *AIDS* 1991 May;5(5):519-25.
- Fidel PL Jr, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1999 Jan;12(1):80-96.
- Fleming TJ, Fleming ML, Malek TR. Selective expression of Ly-6G on myeloid lineage cells in mouse bone marrow. RB6-8C5 mAb to granulocyte-differentiation antigen (Gr-1) detects members of the Ly-6 family. *J Immunol* 1993 Sep;151(5):2399-408.
- Flint SJ, Enquist LW, Krug RM, Flint SJ, Salka AM. *Principles of Virology: Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. 2000.
- Flo RW, Naess A, Nilsen A, Harthug S, Solberg CO. A longitudinal study of phagocyte function in HIV-infected patients. *AIDS* 1994 Jun;8(6):771-7.
- Fong IW, Laurel M, Burford-Mason A. Asymptomatic oral carriage of *Candida albicans* in patients with HIV infection. *Clin Invest Med* 1997 Apr;20(2):85-93.
- Frohm M, Agerberth B, Ahangari G, Stahle-Backdahl M, Liden S, Wigzell H, et al. The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders. *J Biol Chem* 1997 Jun;272(24):15258-63.
- Fung-Leung WP, Schilham MW, Rahemtulla A, Kundig TM, Vollenweider M, Potter J, et al. CD8 is needed for development of cytotoxic T cells but not helper T cells. *Cell* 1991 May;65(3):443-9.
- Garcia JV, Alfano J, Miller AD. The negative effect of human immunodeficiency virus type 1 Nef on cell surface CD4 expression is not species specific and requires the cytoplasmic domain of CD4. *J Virol* 1993 Mar;67(3):1511-6.
- Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clin Microbiol Rev* 2000 Jan;13(1):122-43.
- Girolomoni G, Caux C, Lebecque S, Dezutter-Dambuyant C, Ricciardi-Castagnoli P. Langerhans cells: still a fundamental paradigm for studying the immunobiology of dendritic cells. *Trends Immunol* 2002 Jan;23(1):6-8.
- Glick M, Siegel, MA. *Infect. Dis. Clin. N. AM* 1999; 13:817-831
- Gordon SB, Molyneux ME, Boeree MJ, Kanyanda S, Chaponda M, Squire SB, et al. Opsonic phagocytosis of *Streptococcus pneumoniae* by alveolar macrophages is not impaired in human immunodeficiency virus-infected Malawian adults. *J Infect Dis* 2001 Nov;184(10):1345-9.

- Goto Y, Yeh CK, Notkins AL, Prabhakar BS. Detection of proviral sequences in saliva of patients infected with human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1991 Mar;7(3):343-7.
- Grunfeld C, Feingold KR. Metabolic disturbances and wasting in the acquired immunodeficiency syndrome. *N Engl J Med* 1992 Jul;327(5):329-37.
- Guthmiller JM, Vargas KG, Srikantha R, Schomberg LL, Weistroffer PL, McCray PB Jr, et al. Susceptibilities of oral bacteria and yeast to mammalian cathelicidins. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Nov;45(11):3216-9.
- Haas W, Tonegawa S. Development and selection of gamma delta T cells. *Curr Opin Immunol* 1992 Apr;4(2):147-55.
- Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood* 1998 Nov;92(9):3007-17.
- Han Y, Cutler JE. Assessment of a mouse model of neutropenia and the effect of an anti-candidiasis monoclonal antibody in these animals. *J Infect Dis* 1997 May;175(5):1169-75.
- Hanna Z, Kay DG, Cool M, Jothy S, Rebai N, Jolicoeur P. Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease. *J Virol* 1998 Jan;72(1):121-32.
- Hanna Z, Kay DG, Rebai N, Guimond A, Jothy S, Jolicoeur P. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 1998 Oct;95(2):163-75.
- Hanna Z, Rebai N, Poudrier J, Jolicoeur P. Distinct regulatory elements are required for faithful expression of human CD4 in T cells, macrophages, and dendritic cells of transgenic mice. *Blood* 2001 Oct;98(7):2275-8.
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem* 2001 Feb;276(8):5707-13.
- Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM. A peptide antibiotic from human skin. *Nature* 1997 Jun;387(6636):861.
- Herbein G, Mahlkecht U, Batliwalla F, Gregersen P, Pappas T, Butler J, et al. Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature* 1998 Sep;395(6698):189-94.
- Hidore MR, Nabavi N, Sonleitner F, Murphy JW. Murine natural killer cells are fungicidal to *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1991 May;59(5):1747-54.

- Hill MW, Berg JH, Mackenzie IC. Quantitative evaluation of regional differences between epithelia in the adult mouse. *Arch Oral Biol* 1981;26(12):1063-7.
- Ho WZ, Cherukuri R, Douglas SD. The macrophage and HIV-1. *Immunol Ser* 1994;60:569-87.
- Holm K, Maki M, Savilahti E, Lipsanen V, Laippala P, Koskimies S. Intraepithelial gamma delta T-cell-receptor lymphocytes and genetic susceptibility to coeliac disease. *Lancet* 1992 Jun;339(8808):1500-3.
- Holoshitz J, Koning F, Coligan JE, De Bruyn J, Strober S. Isolation of CD4- CD8-mycobacteria-reactive T lymphocyte clones from rheumatoid arthritis synovial fluid. *Nature* 1989 May;339(6221):226-9.
- Hostetter MK. Adhesins and ligands involved in the interaction of *Candida* spp. with epithelial and endothelial surfaces. *Clin Microbiol Rev* 1994 Jan;7(1):29-42.
- Huang GT, Eckmann L, Savidge TC, Kagnoff MF. Infection of human intestinal epithelial cells with invasive bacteria upregulates apical intercellular adhesion molecule-1 (ICAM)-1 expression and neutrophil adhesion. *J Clin Invest* 1996 Jul;98(2):572-83.
- Hube B, Ruchel R, Monod M, Sanglard D, Odds FC. Functional aspects of secreted *Candida* proteinases. *Adv Exp Med Biol* 1998;436:339-44.
- Ibrahim AS, Mirbod F, Filler SG, Banno Y, Cole GT, Kitajima Y, et al. Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect Immun* 1995 May;63(5):1993-8.
- Imam N, Carpenter CC, Mayer KH, Fisher A, Stein M, Danforth SB. Hierarchical pattern of mucosal candida infections in HIV-seropositive women. *Am J Med* 1990 Aug;89(2):142-6.
- Inaba K, Witmer-Pack M, Inaba M, Hathcock KS, Sakuta H, Azuma M, et al. The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro. *J Exp Med* 1994 Nov;180(5):1849-60.
- Ives NJ, Gazzard BG, Easterbrook PJ. The changing pattern of AIDS-defining illnesses with the introduction of highly active antiretroviral therapy (HAART) in a London clinic. *J Infect* 2001 Feb;42(2):134-9.
- Jeganathan S, Chan YC. Immunodiagnosis in oral candidiasis. A review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992 Oct;74(4):451-4.
- Jensen J, Vazquez-Torres A, Balish E. Poly(I.C)-induced interferons enhance susceptibility of SCID mice to systemic candidiasis. *Infect Immun* 1992 Nov;60(11):4549-57.

- Jensen J, Warner T, Balish E. Resistance of SCID mice to *Candida albicans* administered intravenously or colonizing the gut: role of polymorphonuclear leukocytes and macrophages. *J Infect Dis* 1993 Apr;167(4):912-9.
- Jensen J, Warner T, Balish E. The role of phagocytic cells in resistance to disseminated candidiasis in granulocytopenic mice. *J Infect Dis* 1994 Oct;170(4):900-5.
- Jones-Carson J, Vazquez-Torres A, Balish E. Defective killing of *Candida albicans* hyphae by neutrophils from beige mice. *J Infect Dis* 1995 Jun;171(6):1664-7.
- Jones-Carson J, Vazquez-Torres A, Warner T, Balish E. Disparate requirement for T cells in resistance to mucosal and acute systemic candidiasis. *Infect Immun* 2000 Apr;68(4):2363-5.
- Kagi D, Ledermann B, Burki K, Seiler P, Odermatt B, Olsen KJ, et al. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* 1994 May;369(6475):31-7.
- Kamai Y, Kubota M, Kamai Y, Hosokawa T, Fukuoka T, Filler SG. Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* 2002 Sep;70(9):5256-8.
- Kamai Y, Kubota M, Kamai Y, Hosokawa T, Fukuoka T, Filler SG. New model of oropharyngeal candidiasis in mice. *Antimicrob Agents Chemother* 2001 Nov;45(11):3195-7.
- Kanazawa S, Okamoto T, Peterlin BM. Tat competes with CIITA for the binding to P-TEFb and blocks the expression of MHC class II genes in HIV infection. *Immunity* 2000 Jan;12(1):61-70.
- Kantor AB, Herzenberg LA. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol* 1993;11:501-38.
- Karam SM. Lineage commitment and maturation of epithelial cells in the gut. *Front Biosci* 1999 Mar;4:D286-98.
- Katou K, Mori K. Autoimmune hepatitis with drug-induced pneumonia due to Sho-saiko-to. *Nihon Kokyuki Gakkai Zasshi* 1999 Aug;37(8):641-6.
- Katz MH, Greenspan D, Westenhause J, Hessol NA, Buchbinder SP, Lifson AR, et al. Progression to AIDS in HIV-infected homosexual and bisexual men with hairy leukoplakia and oral candidiasis. *AIDS* 1992 Jan;6(1):95-100.
- Katz SI, Tamaki K, Sachs DH. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 1979 Nov;282(5736):324-6.

- Kedzierska K, Azzam R, Ellery P, Mak J, Jaworowski A, Crowe SM. Defective phagocytosis by human monocyte/macrophages following HIV-1 infection: underlying mechanisms and modulation by adjunctive cytokine therapy. *J Clin Virol* 2003 Feb;26(2):247-63.
- Kedzierska K, Crowe SM. Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications. *Antivir Chem Chemother* 2001 May;12(3):133-50.
- Kedzierska K, Mak J, Mijch A, Cooke I, Rainbird M, Roberts S, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor augments phagocytosis of *Mycobacterium avium* complex by human immunodeficiency virus type 1-infected monocytes/macrophages in vitro and in vivo. *J Infect Dis* 2000 Jan;181(1):390-4.
- Kendrick B. *The fifth kingdom*, third edition. 2000.
- Kleinegger CL, Stoeckel DC, Kurago ZB. A comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2001 Jul;92(1):62-7.
- Klotman PE, Notkins AL. Transgenic models of human immunodeficiency virus type-1. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;206:197-222.
- Knight SC, Stagg AJ. Antigen-presenting cell types. *Curr Opin Immunol* 1993 Jun;5(3):374-82.
- Kripke ML, Munn CG, Jeevan A, Tang JM, Bucana C. Evidence that cutaneous antigen-presenting cells migrate to regional lymph nodes during contact sensitization. *J Immunol* 1990 Nov;145(9):2833-8.
- Krueger JG, Krane JF, Carter DM, Gottlieb AB. Role of growth factors, cytokines, and their receptors in the pathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol* 1990 Jun;94(6 Suppl):135S-40S.
- Kvaal C, Lachke SA, Srikantha T, Daniels K, McCoy J, Soll DR. Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection. *Infect Immun* 1999 Dec;67(12):6652-62.
- Kvaal CA, Srikantha T, Soll DR. Misexpression of the white-phase-specific gene WH11 in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect Immun* 1997 Nov;65(11):4468-75.
- Lacasse M, Fortier C, Trudel L, Collet AJ, Deslauriers N. Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects. *J Oral Pathol Med* 1990 Mar;19(3):136-41.
- Lafrenie RM, Wahl LM, Epstein JS, Hewlett IK, Yamada KM, Dhawan S. HIV-1-Tat protein promotes chemotaxis and invasive behavior by monocytes. *J Immunol* 1996 Aug;157(3):974-7.

- Laible NJ, Germaine GR. Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides. *Infect Immun* 1985 Jun;48(3):720-8.
- Lal K, Santarpia RP 3rd, Xu L, Manssuri F, Pollock JJ. One-step purification of histidine-rich polypeptides from human parotid saliva and determination of anti-candidal activity. *Oral Microbiol Immunol* 1992 Feb;7(1):44-50.
- Lanier LL. NK cell receptors. *Annu Rev Immunol* 1998;16:359-93.
- Lanier LL, Phillips JH. Ontogeny of natural killer cells. *Nature* 1986 Jan;319(6051):269-70.
- Larsen CP, Steinman RM, Witmer-Pack M, Hankins DF, Morris PJ, Austyn JM. Migration and maturation of Langerhans cells in skin transplants and explants. *J Exp Med* 1990 Nov;172(5):1483-93.
- Lazzarin A, Uberti Foppa C, Galli M, Mantovani A, Poli G, Franzetti F, et al. Impairment of polymorphonuclear leucocyte function in patients with acquired immunodeficiency syndrome and with lymphadenopathy syndrome. *Clin Exp Immunol* 1986 Jul;65(1):105-11.
- Le Gall S, Prevost MC, Heard JM, Schwartz O. Human immunodeficiency virus type I Nef independently affects virion incorporation of major histocompatibility complex class I molecules and virus infectivity. *Virology* 1997 Mar;229(1):295-301.
- Leidich SD, Ibrahim AS, Fu Y, Koul A, Jessup C, Vitullo J, et al. Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*. *J Biol Chem* 1998 Oct;273(40):26078-86.
- Leigh JE, Barousse M, Swoboda RK, Myers T, Hager S, Wolf NA, et al. Candida-specific systemic cell-mediated immune reactivities in human immunodeficiency virus-positive persons with mucosal candidiasis. *J Infect Dis* 2001 Jan;183(2):277-85.
- Leigh JE, Steele C, Wormley FL Jr, Luo W, Clark RA, Gallaher W, et al. Th1/Th2 cytokine expression in saliva of HIV-positive and HIV-negative individuals: a pilot study in HIV-positive individuals with oropharyngeal candidiasis. *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998 Dec;19(4):373-80.
- Levine MS, Macones AJ Jr, Laufer I. Candida esophagitis: accuracy of radiographic diagnosis. *Radiology* 1985 Mar;154(3):581-7.
- Levitz SM, Dupont MP, Smail EH. Direct activity of human T lymphocytes and natural killer cells against *Cryptococcus neoformans*. *Infect Immun* 1994 Jan;62(1):194-202.

- Levy JA, Mackewicz CE, Barker E. Controlling HIV pathogenesis: the role of the noncytotoxic anti-HIV response of CD8⁺ T cells. *Immunol Today* 1996 May;17(5):217-24.
- Lin AL, Johnson DA, Patterson TF, Wu Y, Lu DL, Shi Q, et al. Salivary anticandidal activity and saliva composition in an HIV-infected cohort. *Oral Microbiol Immunol* 2001 Oct;16(5):270-8.
- Linsley PS, Ledbetter JA. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annu Rev Immunol* 1993;11:191-212.
- Liu YJ, Johnson GD, Gordon J, MacLennan IC. Germinal centres in T-cell-dependent antibody responses. *Immunol Today* 1992 Jan;13(1):17-21.
- Lloyd A. HIV infection and AIDS. *P N G Med J* 1996 Sep;39(3):174-80.
- Lu XS, Delfraissy JF, Grangeot-Keros L, Rannou MT, Pillot J. Rapid and constant detection of HIV antibody response in saliva of HIV-infected patients; selective distribution of anti-HIV activity in the IgG isotype. *Res Virol* 1994 Nov-1994 Dec;145(6):369-77.
- Mandel ID, Barr CE, Turgeon L. Longitudinal study of parotid saliva in HIV-1 infection. *J Oral Pathol Med* 1992 May;21(5):209-13.
- Margolick JB, Munoz A, Donnenberg AD, Park LP, Galai N, Giorgi JV, et al. Failure of T-cell homeostasis preceding AIDS in HIV-1 infection. The Multicenter AIDS Cohort Study. *Nat Med* 1995 Jul;1(7):674-80.
- Marieb EN. *Anatomie et physiologie humaine*. 1999.
- Matthews HL, Witek-Janusek L. Host defense against oral oesophageal candidiasis. *Candida and candidiasis*, chapter 13. 2002; 179-192.
- McIlroy D, Autran B, Clauvel JP, Oksenhendler E, Debre P, Hosmalin A. Low CD83, but normal MHC class II and costimulatory molecule expression, on spleen dendritic cells from HIV⁺ patients. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1998 Apr;14(6):505-13.
- Mestecky, J.; Russell, M. W.; Jackson, S., and Brown, T. A. The human IgA system: a reassessment. *Clin Immunol Immunopathol*. 1986 Jul; 40(1):105-14.
- Meyaard L, Hovenkamp E, Otto SA, Miedema F. IL-12-induced IL-10 production by human T cells as a negative feedback for IL-12-induced immune responses. *J Immunol* 1996 Apr;156(8):2776-82.
- Meyaard L, Otto SA, Jonker RR, Mijster MJ, Keet RP, Miedema F. Programmed death of T cells in HIV-1 infection. *Science* 1992 Jul;257(5067):217-9.

- Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM, Torigian V, Uyemura K, Rea TH, et al. Lymphocytes bearing antigen-specific gamma delta T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* 1989 Jun;339(6225):544-8.
- Montessori V, Press N, Harris M, Akagi L, Montaner JS. Adverse effects of antiretroviral therapy for HIV infection. *CMAJ* 2004 Jan;170(2):229-38.
- Morrow B, Srikantha T, Anderson J, Soll DR. Coordinate regulation of two opaque-phase-specific genes during white-opaque switching in *Candida albicans*. *Infect Immun* 1993 May;61(5):1823-8.
- Mosier DE. Animal models for retrovirus-induced immunodeficiency disease. *Immunol Invest* 1986 May;15(3):233-61.
- Muhlschlegel FA, Fonzi WA. PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Mol Cell Biol* 1997 Oct;17(10):5960-7.
- Muller F, Froland SS, Brandtzaeg P, Fagerhol MK. Oral candidiasis is associated with low levels of parotid calprotectin in individuals with infection due to human immunodeficiency virus. *Clin Infect Dis* 1993 Feb;16(2):301-2.
- Muller F, Froland SS, Hvatum M, Radl J, Brandtzaeg P. Both IgA subclasses are reduced in parotid saliva from patients with AIDS. *Clin Exp Immunol* 1991 Feb;83(2):203-9.
- Muller F, Holberg-Petersen M, Rollag H, Degre M, Brandtzaeg P, Froland SS. Nonspecific oral immunity in individuals with HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1992;5(1):46-51.
- Muller F, Rollag H, Froland SS. Reduced oxidative burst responses in monocytes and monocyte-derived macrophages from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol* 1990 Oct;82(1):10-5.
- Murakami M, Lopez-Garcia B, Braff M, Dorschner RA, Gallo RL. Postsecretory processing generates multiple cathelicidins for enhanced topical antimicrobial defense. *J Immunol* 2004 Mar;172(5):3070-7.
- Murphy JW. Mechanisms of natural resistance to human pathogenic fungi. *Annu Rev Microbiol* 1991;45:509-38.
- Murthy AR, Lehrer RI, Harwig SS, Miyasaki KT. In vitro candidastatic properties of the human neutrophil calprotectin complex. *J Immunol* 1993 Dec;151(11):6291-301.
- Myers TA, Leigh JE, Arribas AR, Hager S, Clark R, Lilly E, et al. Immunohistochemical evaluation of T cells in oral lesions from human immunodeficiency virus-positive persons with oropharyngeal candidiasis. *Infect Immun* 2003 Feb;71(2):956-63.

- Myint M, Steinsvoll S, Yuan ZN, Johne B, Helgeland K, Schenck K. Highly increased numbers of leukocytes in inflamed gingiva from patients with HIV infection. *AIDS* 2002 Jan;16(2):235-43.
- Nathanson N , Ahmed R, Brinton MA, Chow LT, Gonzalez-Scarano F. *Viral Pathogenesis and Immunity*. 2001:pp. 220.
- Nielsen H, Bentsen KD, Hojtvad L, Willemoes EH, Scheutz F, Schiodt M, et al. Oral candidiasis and immune status of HIV-infected patients. *J Oral Pathol Med* 1994 Mar;23(3):140-3.
- Nielsen H, Kharazmi A, Faber V. Blood monocyte and neutrophil functions in the acquired immune deficiency syndrome. *Scand J Immunol* 1986 Sep;24(3):291-6.
- Nikawa H, Samaranayake LP, Tenovuo J, Pang KM, Hamada T. The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*. *Arch Oral Biol* 1993 Dec;38(12):1057-63.
- Nottet HS, de Graaf L, de Vos NM, Bakker LJ, van Strijp JA, Visser MR, et al. Phagocytic function of monocyte-derived macrophages is not affected by human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis* 1993 Jul;168(1):84-91.
- Odds FC. Biological aspects of pathogenic *candida spp*. In *Candida and candidosis* 1988 :7-15.
- ONUSIDA/OMS. Le point sur l'épidémie du SIDA. 2003. Document Internet disponible sur : www.unaids.org.
- Pappas PG, Rex JH, Lee J, Hamill RJ, Larsen RA, Powderly W, et al. A prospective observational study of candidemia: epidemiology, therapy, and influences on mortality in hospitalized adult and pediatric patients. *Clin Infect Dis* 2003 Sep;37(5):634-43.
- Parker DC. T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 1993;11:331-60.
- Patton LL. Sensitivity, specificity, and positive predictive value of oral opportunistic infections in adults with HIV/AIDS as markers of immune suppression and viral burden. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000 Aug;90(2):182-8.
- Pitrak DL, Bak PM, DeMarais P, Novak RM, Andersen BR. Depressed neutrophil superoxide production in human immunodeficiency virus infection. *J Infect Dis* 1993 Jun;167(6):1406-10.
- Poli G, Bottazzi B, Acero R, Bersani L, Rossi V, Introna M, et al. Monocyte function in intravenous drug abusers with lymphadenopathy syndrome and in patients with acquired immunodeficiency syndrome: selective impairment of chemotaxis. *Clin Exp Immunol* 1985 Oct;62(1):136-42.

- Polonelli L, Gerloni M, Conti S, Fiscaro P, Cantelli C, Portincasa P, et al. Heat-shock mannoproteins as targets of secretory IgA in *Candida albicans*. J Infect Dis 1994 Jun;169(6):1401-5.
- Polonelli L, Seguy N, Conti S, Gerloni M, Bertolotti D, Cantelli C, et al. Monoclonal yeast killer toxin-like candidacidal anti-idiotypic antibodies. Clin Diagn Lab Immunol 1997 Mar;4(2):142-6.
- Pope M. Mucosal dendritic cells and immunodeficiency viruses. J Infect Dis 1999 May;179 Suppl 3:S427-30.
- Porro GB, Parente F, Cernuschi M. The diagnosis of esophageal candidiasis in patients with acquired immune deficiency syndrome: is endoscopy always necessary? Am J Gastroenterol 1989 Feb;84(2):143-6.
- Powderly WG, Robinson K, Keath EJ. Molecular typing of *Candida albicans* isolated from oral lesions of HIV-infected individuals. AIDS 1992 Jan;6(1):81-4.
- Prescott, Harley et Klein. Microbiologie. 1995.
- Provenza V. Fundamentals of oral histology and embryology, second edition. 1988.
- Qian Q, Jutila MA, Van Rooijen N, Cutler JE. Elimination of mouse splenic macrophages correlates with increased susceptibility to experimental disseminated candidiasis. J Immunol 1994 May;152(10):5000-8.
- Qureshi MN, Barr CE, Hewlitt I, Boorstein R, Kong F, Bagasra O, et al. Detection of HIV in oral mucosal cells. Oral Dis 1997 May;3 Suppl 1:S73-8.
- Reichart PA, Samaranayake LP, Philipsen HP. Pathology and clinical correlates in oral candidiasis and its variants: a review. Oral Dis 2000 Mar;6(2):85-91.
- Rhee SS, Marsh JW. Human immunodeficiency virus type 1 Nef-induced down-modulation of CD4 is due to rapid internalization and degradation of surface CD4. J Virol 1994 Aug;68(8):5156-63.
- Romagnoli P, Pimpinelli N, Mori M, Reichart PA, Eversole LR, Ficarra G. Immunocompetent cells in oral candidiasis of HIV-infected patients: an immunohistochemical and electron microscopical study. Oral Dis 1997 Jun;3(2):99-105.
- Romani L. Immunity to *Candida albicans*: Th1, Th2 cells and beyond. Curr Opin Microbiol 1999 Aug;2(4):363-7.
- Romani L, Mencacci A, Cenci E, Del Sero G, Bistoni F, Puccetti P. An immunoregulatory role for neutrophils in CD4+ T helper subset selection in mice with candidiasis. J Immunol 1997 Mar;158(5):2356-62.
- Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. APMIS 2003 Jul-2003 Aug;111(7-8):725-40.

- Romani N, Koide S, Crowley M, Witmer-Pack M, Livingstone AM, Fathman CG, et al. Presentation of exogenous protein antigens by dendritic cells to T cell clones. Intact protein is presented best by immature, epidermal Langerhans cells. *J Exp Med* 1989 Mar;169(3):1169-78.
- Romani N, Ratzinger G, Pfaller K, Salvenmoser W, Stossel H, Koch F, et al. Migration of dendritic cells into lymphatics-the Langerhans cell example: routes, regulation, and relevance. *Int Rev Cytol* 2001;207:237-70.
- Roussilhon C, Agrapart M, Guglielmi P, Bensussan A, Brasseur P, Ballet JJ. Human TcR gamma delta+ lymphocyte response on primary exposure to *Plasmodium falciparum*. *Clin Exp Immunol* 1994 Jan;95(1):91-7.
- Ryder MI, Winkler JR, Weinreb RN. Elevated phagocytosis, oxidative burst, and F-actin formation in PMNs from individuals with intraoral manifestations of HIV infection. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1988;1(4):346-53.
- Samaranayake LP. Oral mycoses in HIV infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992 Feb;73(2):171-80.
- Samaranayake LP, Holmstrup P. Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection. *J Oral Pathol Med* 1989 Dec;18(10):554-64.
- Samaranayake YH, Samaranayake LP. Experimental oral candidiasis in animal models. *Clin Microbiol Rev* 2001a Apr;14(2):398-429.
- Samaranayake YH, Samaranayake LP, Pow EH, Beena VT, Yeung KW. Antifungal effects of lysozyme and lactoferrin against genetically similar, sequential *Candida albicans* isolates from a human immunodeficiency virus-infected southern Chinese cohort. *J Clin Microbiol* 2001b Sep;39(9):3296-302.
- San Millan R, Elguezabal N, Regulez P, Moragues MD, Quindos G, Ponton J. Effect of salivary secretory IgA on the adhesion of *Candida albicans* to polystyrene. *Microbiology* 2000 Sep;146 (Pt 9):2105-12.
- Sangeorzan JA, Bradley SF, He X, Zarins LT, Ridenour GL, Tiballi RN, et al. Epidemiology of oral candidiasis in HIV-infected patients: colonization, infection, treatment, and emergence of fluconazole resistance. *Am J Med* 1994 Oct;97(4):339-46.
- Santhanagopalan V, Hahn BL, Sohnle PG. Resistance of zinc-supplemented *Candida albicans* cells to the growth inhibitory effect of calprotectin. *J Infect Dis* 1995 May;171(5):1289-94.
- Saporito-Irwin SM, Birse CE, Sypherd PS, Fonzi WA. PHR1, a pH-regulated gene of *Candida albicans*, is required for morphogenesis. *Mol Cell Biol* 1995 Feb;15(2):601-13.

- Schaffner A, Davis CE, Schaffner T, Markert M, Douglas H, Braude AI. In vitro susceptibility of fungi to killing by neutrophil granulocytes discriminates between primary pathogenicity and opportunism. *J Clin Invest* 1986 Aug;78(2):511-24.
- Schaller M, Schafer W, Korting HC, Hube B. Differential expression of secreted aspartyl proteinases in a model of human oral candidosis and in patient samples from the oral cavity. *Mol Microbiol* 1998 Jul;29(2):605-15.
- Schmuth M, Neyer S, Rainer C, Grassegger A, Fritsch P, Romani N, et al. Expression of the C-C chemokine MIP-3 alpha/CCL20 in human epidermis with impaired permeability barrier function. *Exp Dermatol* 2002 Apr;11(2):135-42.
- Schwartz O, Marechal V, Le Gall S, Lemonnier F, Heard JM. Endocytosis of major histocompatibility complex class I molecules is induced by the HIV-1 Nef protein. *Nat Med* 1996 Mar;2(3):338-42.
- Siegenthaler G, Roulin K, Chatellard-Gruaz D, Hotz R, Saurat JH, Hellman U, et al. A heterocomplex formed by the calcium-binding proteins MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9) binds unsaturated fatty acids with high affinity. *J Biol Chem* 1997 Apr;272(14):9371-7.
- Singh PK, Jia HP, Wiles K, Hesselberth J, Liu L, Conway BA, et al. Production of beta-defensins by human airway epithelia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998 Dec;95(25):14961-6.
- Sohnle PG, Hahn BL, Santhanagopalan V. Inhibition of *Candida albicans* growth by calprotectin in the absence of direct contact with the organisms. *J Infect Dis* 1996 Dec;174(6):1369-72.
- Soll DR. High-frequency switching in *Candida albicans*. *Clin Microbiol Rev* 1992 Apr;5(2):183-203.
- Sonneborn A, Tebarth B, Ernst JF. Control of white-opaque phenotypic switching in *Candida albicans* by the Efg1p morphogenetic regulator. *Infect Immun* 1999 Sep;67(9):4655-60.
- Sonza S, Maerz A, Deacon N, Meanger J, Mills J, Crowe S. Human immunodeficiency virus type 1 replication is blocked prior to reverse transcription and integration in freshly isolated peripheral blood monocytes. *J Virol* 1996 Jun;70(6):3863-9.
- Spear GT, Kessler HA, Rothberg L, Phair J, Landay AL. Decreased oxidative burst activity of monocytes from asymptomatic HIV-infected individuals. *Clin Immunol Immunopathol* 1990 Feb;54(2):184-91.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* 1994 Jan;76(2):301-14.

- Squier CA. The permeability of oral mucosa. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2(1):13-32.
- Squier CA, Kremer MJ. Biology of oral mucosa and esophagus. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001;(29):7-15.
- Srikantha T, Tsai LK, Daniels K, Soll DR. EFG1 null mutants of *Candida albicans* switch but cannot express the complete phenotype of white-phase budding cells. *J Bacteriol* 2000 Mar;182(6):1580-91.
- Steele C, Fidel PL Jr. Cytokine and chemokine production by human oral and vaginal epithelial cells in response to *Candida albicans*. *Infect Immun* 2002 Feb;70(2):577-83.
- Steele C, Leigh J, Swoboda R, Fidel PL Jr. Growth inhibition of *Candida* by human oral epithelial cells. *J Infect Dis* 2000 Nov;182(5):1479-85.
- Stein M, Keshav S. The versatility of macrophages. *Clin Exp Allergy* 1992 Jan;22(1):19-27.
- Sugiyama Y, Nakashima S, Mirbod F, Kanoh H, Kitajima Y, Ghannoum MA, et al. Molecular cloning of a second phospholipase B gene, caPLB2 from *Candida albicans*. *Med Mycol* 1999 Feb;37(1):61-7.
- Sweet SP. Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection. *Oral Dis* 1997 May;3 Suppl 1:S88-95.
- Sweet SP, Denbury AN, Challacombe SJ. Salivary calprotectin levels are raised in patients with oral candidiasis or Sjogren's syndrome but decreased by HIV infection. *Oral Microbiol Immunol* 2001 Apr;16(2):119-23.
- Sweet SP, Rahman D, Challacombe SJ. IgA subclasses in HIV disease: dichotomy between raised levels in serum and decreased secretion rates in saliva. *Immunology* 1995 Dec;86(4):556-9.
- Tabak LA. In defense of the oral cavity: structure, biosynthesis, and function of salivary mucins. *Annu Rev Physiol* 1995;57:547-64.
- Tepper RI, Coffman RL, Leder P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 1992 Jul;257(5069):548-51.
- Thepen T, van Rooijen N, Kraal G. Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice. *J Exp Med* 1989 Aug;170(2):499-509.
- Tomasinsig L, Scocchi M, Di Loreto C, Artico D, Zanetti M. Inducible expression of an antimicrobial peptide of the innate immunity in polymorphonuclear leukocytes. *J Leukoc Biol* 2002 Nov;72(5):1003-10.

- Trial J, Birdsall HH, Hallum JA, Crane ML, Rodriguez-Barradas MC, de Jong AL, et al. Phenotypic and functional changes in peripheral blood monocytes during progression of human immunodeficiency virus infection. Effects of soluble immune complexes, cytokines, subcellular particulates from apoptotic cells, and HIV-1-encoded proteins on monocytes phagocytic function, oxidative burst, transendothelial migration, and cell surface phenotype. *J Clin Invest* 1995 Apr;95(4):1690-701.
- Troxler RF, Offner GD, Xu T, Vanderspek JC, Oppenheim FG. Structural relationship between human salivary histatins. *J Dent Res* 1990 Jan;69(1):2-6.
- Tschachler E, Groh V, Popovic M, Mann DL, Konrad K, Safai B, et al. Epidermal Langerhans cells--a target for HTLV-III/LAV infection. *J Invest Dermatol* 1987 Feb;88(2):233-7.
- Tylenda CA, Larsen J, Yeh CK, Lane HC, Fox PC. High levels of oral yeasts in early HIV-1 infection. *J Oral Pathol Med* 1989 Oct;18(9):520-4.
- van Heyningen V, Dorin J. Possible role for two calcium-binding proteins of the S-100 family, co-expressed in granulocytes and certain epithelia. *Adv Exp Med Biol* 1990;269:139-43.
- van Rooijen N, Kors N, Kraal G. Macrophage subset repopulation in the spleen: differential kinetics after liposome-mediated elimination. *J Leukoc Biol* 1989 Feb;45(2):97-104.
- van Rooijen N, Kors N, vd Ende M, Dijkstra CD. Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate. *Cell Tissue Res* 1990 May;260(2):215-22.
- van Rooijen N, Sanders A. Elimination, blocking, and activation of macrophages: three of a kind? *J Leukoc Biol* 1997 Dec;62(6):702-9.
- van Rooijen N, Sanders A. Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications. *J Immunol Methods* 1994 Sep;174(1-2):83-93.
- Vargas K, Wertz PW, Drake D, Morrow B, Soll DR. Differences in adhesion of *Candida albicans* 3153A cells exhibiting switch phenotypes to buccal epithelium and stratum corneum. *Infect Immun* 1994 Apr;62(4):1328-35.
- Vazquez-Torres A, Balish E. Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol Mol Biol Rev* 1997 Jun;61(2):170-92.
- Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Balish E. Candidacidal activity of macrophages from immunocompetent and congenitally immunodeficient mice. *J Infect Dis* 1994 Jul;170(1):180-8.

- Vazquez-Torres A, Jones-Carson J, Warner T, Balish E. Nitric oxide enhances resistance of SCID mice to mucosal candidiasis. *J Infect Dis* 1995 Jul;172(1):192-8.
- von Boehmer H, Swat W, Kisielow P. Positive selection of immature alpha beta T cells. *Immunol Rev* 1993 Oct;135:67-79.
- Vroom TM, Scholte G, Ossendorp F, Borst J. Tissue distribution of human gamma delta T cells: no evidence for general epithelial tropism. *J Clin Pathol* 1991 Dec;44(12):1012-7.
- Vudhichamnong K, Walker DM, Ryley HC. The effect of secretory immunoglobulin A on the in-vitro adherence of the yeast *Candida albicans* to human oral epithelial cells. *Arch Oral Biol* 1982;27(8):617-21.
- Williams DW, Potts AJ, Wilson MJ, Matthews JB, Lewis MA. Characterisation of the inflammatory cell infiltrate in chronic hyperplastic candidosis of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 1997 Feb;26(2):83-9.
- Williams N. T cells on the mucosal frontline. *Science* 1998 Apr;280(5361):198-200.
- Wozniak KL, Leigh JE, Hager S, Swoboda RK, Fidel PL Jr. A comprehensive study of *Candida*-specific antibodies in the saliva of human immunodeficiency virus-positive individuals with oropharyngeal candidiasis. *J Infect Dis* 2002 May;185(9):1269-76.
- Wu T, Samaranayake LP, Leung WK, Sullivan PA. Inhibition of growth and secreted aspartyl proteinase production in *Candida albicans* by lysozyme. *J Med Microbiol* 1999 Aug;48(8):721-30.
- Yamashiro S, Kamohara H, Wang JM, Yang D, Gong WH, Yoshimura T. Phenotypic and functional change of cytokine-activated neutrophils: inflammatory neutrophils are heterogeneous and enhance adaptive immune responses. *J Leukoc Biol* 2001 May;69(5):698-704.
- Yang D, Chertov O, Bykovskaia SN, Chen Q, Buffo MJ, Shogan J, et al. Beta-defensins: linking innate and adaptive immunity through dendritic and T cell CCR6. *Science* 1999 Oct;286(5439):525-8.
- Yeh CK, Fox PC, Ship JA, Busch KA, Bermudez DK, Wilder AM, et al. Oral defense mechanisms are impaired early in HIV-1 infected patients. *J Acquir Immune Defic Syndr* 1988;1(4):361-6.
- Yeung SC, Kazazi F, Randle CG, Howard RC, Rizvi N, Downie JC, et al. Patients infected with human immunodeficiency virus type 1 have low levels of virus in saliva even in the presence of periodontal disease. *J Infect Dis* 1993 Apr;167(4):803-9.

- Zambruno G, Mori L, Marconi A, Mongiardo N, De Rienzo B, Bertazzoni U, et al. Detection of HIV-1 in epidermal Langerhans cells of HIV-infected patients using the polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol* 1991 Jun;96(6):979-82.
- Zunino SJ, Hudig D. 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* 1988 Mar;56(3):564-9.



Digitized by Google