

2711.3459.5

Université de Montréal

Immunopathogénèse de la candidose oropharyngée chez la souris  
transgénique exprimant le génome du VIH-1

par

Véronique Dugas

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences  
en microbiologie et immunologie

Août, 2006

©, Véronique Dugas, 2006





## 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 des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Immunopathogénèse de la candidose oropharyngée chez la souris  
transgénique exprimant le génome du VIH-1

présenté par :

Véronique Dugas

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Pierre Auger  
président-rapporteur

Dr Louis de Repentigny  
directeur de recherche

Dr Jean Barbeau  
membre du jury

## Résumé

À ce jour, la candidose oropharyngée (COP) demeure l'infection opportuniste la plus répandue chez les patients infectés au VIH-1. La souris transgénique (Tg) CD4C/HIV<sup>Mut</sup>, qui exprime le génome tronqué du VIH-1, constitue un modèle de COP chronique lorsqu'infectée expérimentalement au niveau buccal par *Candida albicans* LAM-1. Cette souris Tg permet l'étude du rôle des polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) et des macrophages afin de i) restreindre le nombre de *C. albicans* proliférant à la muqueuse buccale et ii) empêcher sa dissémination aux organes profonds. Cette étude démontre que l'activité fongicide des PMNs de souris Tg à l'égard de *C. albicans* est altérée, cependant ils ne sont pas nécessaires afin de limiter le champignon à la muqueuse buccale. Par ailleurs, la phagocytose de *C. albicans* par les macrophages de souris Tg est augmentée, suggérant une activation induite par l'expression de la protéine Nef chez ces cellules.

## Mots clés

Candidose oropharyngée

Macrophage

Modèle animal

Neutrophile

VIH-1

## **Abstract**

To this day, oropharyngeal candidiasis (OPC) remains the most prevalent opportunistic infection among the HIV-1 infected patients. The CD4C/HIV<sup>Mut</sup> transgenic mouse (Tg), which expresses the truncated HIV-1 genome, constitutes a chronic OPC model when experimentally infected in the oral cavity with *Candida albicans* LAM-1. That Tg mouse makes it possible to study the role of polymorphonuclear neutrophils (PMNs) and of macrophages in order to i) restrain *C. albicans* to the oral mucosa and ii) prevent its dissemination to deep organs. This study shows that the killing of *C. albicans* by the PMNs from Tg mice is altered. These are however not necessary in order to restrain the fungus in the oral mucosa. Furthermore, phagocytose of *C. albicans* by Tg mouse macrophages is increased, which suggests an induced activation by the expression of the Nef protein into those cells.

## **Keywords**

Oropharyngeal candidiasis

Macrophage

Neutrophile

HIV-1

Animal model

## Table des matières

<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>iii</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>iv</b>
<b>Liste des sigles et abréviations.....</b>	<b>vii</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>ix</b>
<b>Mise en situation.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : <i>Candida albicans</i> et la candidose oropharyngée.....</b>	<b>1</b>
1.1 Biologie de <i>C. albicans</i> .....	1
1.2 Pathogénèse de l'infection à <i>C. albicans</i> .....	3
1.3 La COP dans le cadre de l'infection au VIH-1 .....	3
1.3.1 La candidose pseudomembraneuse .....	4
1.3.2 La candidose érythémateuse.....	5
1.3.3 Autres formes de COP.....	6
<b>Chapitre 2 : Système immunitaire des muqueuses et défenses à l'égard de <i>C. albicans</i>.....</b>	<b>8</b>
2.1 Immunité innée.....	8
2.1.1 La muqueuse buccale .....	8
2.1.2 Protéines salivaires .....	10
2.1.3 Kératinocytes.....	13
2.1.4 Cellules de Langerhans .....	15
2.1.5 PMNs.....	16
2.1.6 Macrophages .....	17
2.1.7 Cellules NK .....	19
2.2 Immunité acquise .....	19
2.2.1 Lymphocytes B.....	19
2.2.2 Lymphocytes T $\alpha\beta$ .....	20
2.2.3 Lymphocytes T $\gamma\delta$ .....	21
2.3 Facteurs de virulence de <i>C. albicans</i> .....	22

2.3.1 La transformation morphologique.....	22
2.3.2 Les Secreted Aspartic Proteinases.....	23
2.3.3 Les phospholipases.....	24
2.3.4 L'adhérence.....	24
<b>Chapitre 3 : Pathogénèse de la COP chez les patients infectés au VIH-1 .....</b>	<b>25</b>
3.1 Le VIH.....	25
3.1.1 Pathogénèse et épidémiologie .....	25
3.1.2 Mécanismes d'entrée du virus.....	26
3.1.3 Génome et réplication .....	28
3.2 Perturbations des défenses de l'hôte à l'égard de <i>C. albicans</i> .....	29
3.2.1 Réponse à médiation humorale .....	29
3.2.2 Réponse à médiation cellulaire.....	30
3.2.3 Cellules effectrices .....	30
<b>Chapitre 4 : Les modèles animaux permettant l'étude de la COP .....</b>	<b>33</b>
4.1 Les modèles de candidose .....	33
4.2 Souris transgéniques exprimant le génome du VIH-1.....	34
4.2.1 Souris CD4C/HIV <sup>MutA</sup> .....	36
4.2.2 Souris CD4C/HIV <sup>Nef</sup> .....	36
<b>Raisonnement et Hypothèses.....</b>	<b>37</b>
<b>Matériel et Méthodes.....</b>	<b>38</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>52</b>
<b>Discussion .....</b>	<b>78</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>89</b>
<b>Annexe 1 .....</b>	<b>x</b>



## Liste des tableaux

<b>Tableau I : Caractérisation des différentes lignées de souris transgéniques provenant du laboratoire du Dr Paul Jolicoeur .....</b>	<b>38</b>
<b>Tableau II : Décompte des charges de <i>C. albicans</i> retrouvées dans les organes profonds de souris CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>-/-</sup>, 64 jours après avoir reçu un transfert adoptif de lymphocytes T CD8.....</b>	<b>57</b>
<b>Tableau III : Décompte des charges de <i>C. albicans</i> retrouvées dans les organes profonds de souris mCD4/HIV<sup>Nef</sup> et non-Tg, 143 jours après infection buccale.....</b>	<b>60</b>
<b>Tableau IV : Décompte des charges de <i>C. albicans</i> retrouvées dans les organes profonds de souris CD4F/HIV<sup>Nef</sup> et non-Tg, 120 jours après infection buccale.....</b>	<b>63</b>
<b>Tableau V : Énumération des différents types cellulaires retrouvés dans l'exsudat péritonéal de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, de 2 ou 4 mois.....</b>	<b>68</b>
<b>Tableau VI : Bilan de santé des animaux et évaluation de la déplétion des macrophages provenant de la rate ou de la muqueuse buccale, chez des souris non-Tg, suite à l'injection i.v. de PBS, de 0.5mg ou 1.0mg de <math>\lambda</math>-carraghénane.....</b>	<b>77</b>

## Liste des figures

<b>Figure 1 : Mécanismes de contrôle de la morphogénèse chez <i>C. albicans</i> .....</b>	<b>2</b>
<b>Figure 2 : La candidose pseudomembraneuse.....</b>	<b>5</b>
<b>Figure 3 : La candidose érythémateuse.....</b>	<b>6</b>
<b>Figure 4 : Le virus de l'immunodéficience humaine.....</b>	<b>27</b>
<b>Figure 5 : Le génome du VIH-1 .....</b>	<b>28</b>
<b>Figure 6: Structure des transgènes CD4C/HIV<sup>Mut</sup> .....</b>	<b>35</b>
<b>Figure 7: Charge buccale moyenne <math>\pm</math> écart-type de <i>C. albicans</i> retrouvée chez des souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg entre les jours 1 et 56 post-infection.....</b>	<b>53</b>
<b>Figure 8: Charge buccale moyenne <math>\pm</math> écart-type de <i>C. albicans</i> retrouvée chez des souris Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup>, Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>-/-</sup> et Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>+/-</sup> entre les jours 1 et 217 post-infection .....</b>	<b>54</b>
<b>Figure 9: Charge buccale moyenne <math>\pm</math> écart-type de <i>C. albicans</i> retrouvée chez des souris Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>-/-</sup> ayant reçu un transfert adoptif de lymphocytes T CD8 ou de PBS, entre les jours 0 et 62 post-transfert .....</b>	<b>56</b>

- Figure 10: Charge buccale moyenne  $\pm$  écart-type de *C. albicans* retrouvée chez des souris Tg mCD4/HIV<sup>Nef</sup> et des souris non-Tg entre les jours 1 et 143 post-infection ..... 59**
- Figure 11: Charge buccale moyenne  $\pm$  écart-type de *C. albicans* retrouvée chez des souris Tg CD4F/HIV<sup>Nef</sup> et des souris non-Tg entre les jours 1 et 120 post-infection ..... 62**
- Figure 12 : Phagocytose de *C. albicans* par des PMNs de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, infectées ou non à *C. albicans*, (A) 7 jours ou (B) 70 jours après infection buccale..... 65**
- Figure 13 : Activité fongicide à l'égard de *C. albicans* de PMNs circulants de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, infectées ou non à *C. albicans*, (A) 7 jours ou (B) 70 jours après infection buccale ..... 67**
- Figure 14 : Phagocytose de *C. albicans* par des macrophages de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, (A) de 2 ou (B) 4 mois ..... 70**
- Figure 15 : Activité fongicide de macrophages péritonéaux de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, (A) de 2 ou (B) 4 mois, à l'égard de *C. albicans*..... 72**
- Figure 16 : Production de peroxyde d'hydrogène par les macrophages péritonéaux de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, exposées au NaOH, au PMA et à *C. albicans* viable pendant 2 heures, (A) à 2 ou (B) 4 mois d'âge ..... 74**

**Figure 17 : Production d'oxyde nitrique par les macrophages péritonéaux de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, exposées au L-Nmmla, à l'IFN- $\gamma$  et à *C. albicans* inactivé pendant 48 heures, (A) à 2 ou (B) 4 mois d'âge..... 76**

## Liste des sigles et abréviations

ALS : *agglutinin-like sequences*

APC : fluorochrome allophycocyanine

CD4C : modèle « C » du promoteur humain dirigeant l'expression du transgène composé du génome tronqué du VIH-1 chez les souris étudiées.

CD4F : modèle « F » du promoteur humain dirigeant l'expression du transgène composé du génome tronqué du VIH-1 chez les souris étudiées.

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

COP : candidose oropharyngée

DC: cellule dendritique

DC-SIGN : lectine de type C spécifique aux cellules dendritiques

FITC: fluorochrome *fluorescein isothiocyanate*

HAART : *highly active anti-retroviral therapy*

HIV : *human immunodeficiency virus*

IFN: interféron

Ig: immunoglobuline

IL: interleukine

iNOS: *inducible nitric oxide synthase*

LPS: lipopolysaccharide

LTR: *long terminal repeat*

mCD4: promoteur murin dirigeant l'expression du transgène composé du génome tronqué du VIH-1 chez les souris étudiées.

MDM: macrophages dérivés de monocytes circulants

MIP-3: *macrophage inflammatory protein 3*

MΦ: macrophage

NAK: *Nef associated kinase*

NF-κB: Facteur de transcription *nuclear factor-kappaB*

NK: *natural killer*

NO: oxyde nitrique

PAK2: *p-21 activated kinase*

PE : fluorochrome phycoérythrine

PEC: cellule d'exsudat péritonéal

PerCP : fluorochrome *peridinin chlorophyll-a protein*

PL: phospholipase

PMN : polymorphonucléaire neutophile

PRR: *pattern recognition receptor*

Saps : *secreted aspartic proteinase*

SCID : *severe combined immunodeficiency*

SIDA: syndrome d'immunodéficience acquise

SLPI : *secretory leucocyte protease inhibitor*

TCR: *T cell receptor*

Tg: transgénique

TLR: *toll like receptor*

TNF: *tumor necrosis factor*

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

## Remerciements

Merci au Dr Louis de Repentigny,

Pour son accueil chaleureux, son enseignement rigoureux et sa patience lors de mes apprentissages;

Merci aux membres du laboratoire,

Pour leur conseils, leur compagnie et surtout l'aide qu'ils m'ont apportée;

Merci à ma famille,

Pour m'avoir encouragée et soutenue de mille et une façons et pour leur amour;

Merci à mes amis,

Pour avoir toujours cru que ce que je faisais était important, même alors que mes explications semblaient incompréhensibles.

## Mise en situation

*Candida albicans* est une levure commensale chez l'homme. On évalue à 80% la proportion d'adultes sains chez qui *Candida* est retrouvé dans les selles (Gorbach, Nahas et al. 1967), alors qu'environ 40% de la population est porteuse de cette levure au niveau buccal (Arendorf and Walker 1980). Certaines espèces de *Candida* sont par ailleurs opportunistes et deviennent responsables d'infections graves chez les hôtes immunodéprimés. Parmi ces espèces, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. glabrata* et *C. albicans* sont celles le plus souvent retrouvées aux sites d'infections opportunistes (Kremery and Barnes 2002). Chez les patients infectés au VIH-1, la prévalence du développement de la candidose oropharyngée (COP) peut atteindre 90% (Samaranayake and Holmstrup 1989). Même si l'arrivée de traitements antirétroviraux (ex : HAART) a permis de réduire l'incidence et la prévalence de la COP, cette infection demeure fréquente chez les patients séropositifs ayant atteint le stade SIDA.

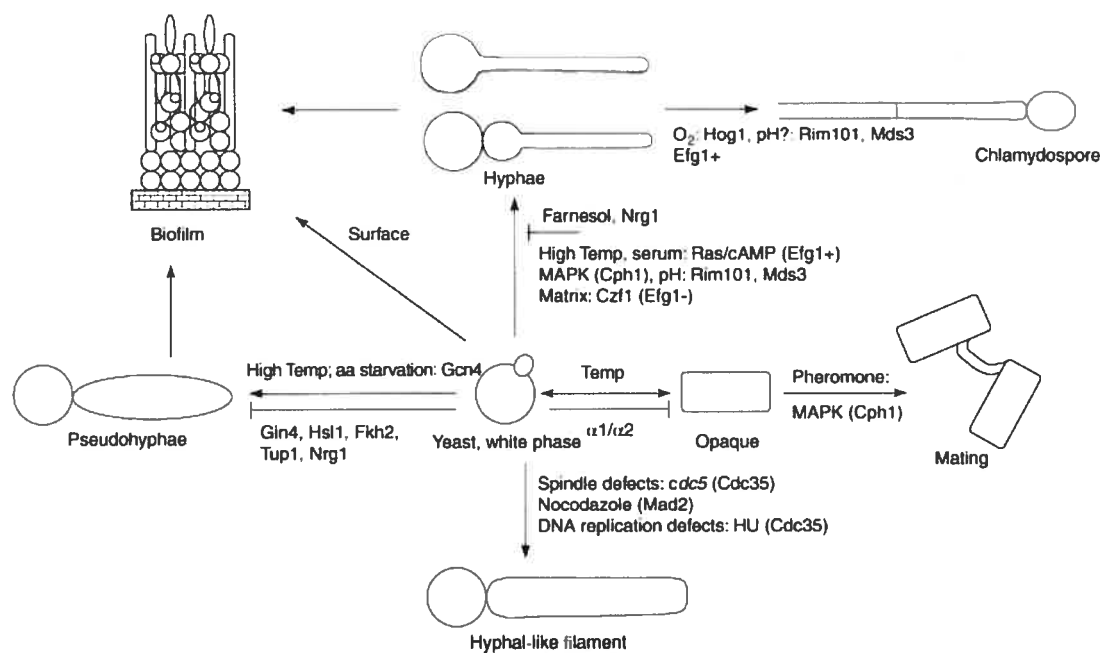
## Chapitre 1 : *Candida albicans* et la candidose oropharyngée

### 1.1 Biologie de *C. albicans*

*Candida albicans* est le principal agent étiologique responsable de la COP (Maenza, Merz et al. 1997). Il s'agit d'un champignon diploïde longtemps considéré comme ayant un cycle de reproduction complètement asexué. Une reproduction sexuée (mating) entre cellules haploïdes  $\alpha$  et  $a$  peut cependant être observée *in vivo* dans des circonstances particulières (Lachke, Lockhart et al. 2003), sous le contrôle du passage de la forme blanche à la forme opaque de *C. albicans* (Bennett and Johnson 2005). La modification phénotypique du champignon de la phase blanche à opaque (ou l'inverse) implique de plus l'expression différentielle de nombreux gènes de virulence permettant une meilleure adaptation à l'environnement et/ou à l'hôte (Kvaal, Lachke et al. 1999).



*C. albicans* est un champignon polymorphe (Figure 1) pouvant se présenter sous forme de levures, d'hyphes, de pseudohyphes ou de chlamydospores (Whiteway and Oberholzer 2004). Alors que les phases levure, pseudohyphe (étape intermédiaire) et hyphe sont souvent rencontrées aux sites de la candidose, les chlamydospores sont plutôt retrouvées *in vitro* (Sonneborn, Bockmuhl et al. 1999). La capacité de *C. albicans* à former des biofilms au niveau buccal et sur les implants médicaux contribue grandement à la virulence du champignon (Kojic and Darouiche 2004).



Current Opinion in Microbiology

Figure 1 : Mécanismes de contrôle de la morphogénèse chez *C. albicans* (Whiteway and Oberholzer 2004)

## 1.2 Pathogénèse de l'infection à *C. albicans*

Les candidoses cutanées et muqueuses peuvent survenir chez des sujets sains ou immunodéprimés. La candidose vaginale à *C. albicans*, par exemple, peut être causée par des perturbations d'ordre hormonale telles que la prise d'anovulants, un changement de pH, une altération de la flore microbienne suite à la prise d'antibiotiques ou un pré-diabète (Galask 1988). De même, les nouveaux-nés sont souvent atteints de muguet buccal suite à l'acquisition du champignon lors de l'accouchement, c'est-à-dire par transmission verticale. Il est aussi possible de contracter une candidose au niveau de la peau ou des ongles (Kirkpatrick 2001).

La candidose systémique ou disséminée est quant à elle plus rare et entraîne un taux de mortalité pouvant atteindre les 50% (Calderone 2002). Certains facteurs de risques lui sont associés, c'est-à-dire une immunosuppression (neutropénie), une chirurgie majeure, l'insertion de matériel médical (cathéters endovasculaires), ainsi qu'une exposition à plusieurs agents antimicrobiens (Jarvis 1995). Les enfants prématurés ainsi que les personnes âgées sont particulièrement susceptibles. Chez les patients porteurs d'un cathéter suite à une intervention chirurgicale, 10% des septicémies nosocomiales sont causées par *Candida sp* (Kojic and Darouiche 2004). La transition entre l'état de porteur sain ou de candidose superficielle à la dissémination sanguine chez les patients immunodéprimés survient généralement lorsque la forme hyphale de *Candida* parvient à envahir et traverser l'épithélium intestinal. Le champignon, une fois dans le sang, peut ensuite infecter les organes vitaux et entraîner la mort très rapidement (Mavor, Thewes et al. 2005).

## 1.3 La COP dans le cadre de l'infection au VIH-1

Chez les patients infectés au VIH-1, il semble qu'une altération des fonctions des cellules épithéliales de la cavité buccale, une perturbation au niveau du nombre et de la fonction des lymphocytes T CD4 ainsi que des défauts de production de

cytokines pourraient permettre l'établissement d'une candidose chronique (Challacombe and Sweet 2002). Effectivement, une corrélation directe est observée entre l'apparition de certains types de COP et la diminution du décompte sanguin de lymphocytes T CD4+ (Feigal, Katz et al. 1991). Les lésions buccales constituent souvent les premières manifestations visibles de l'infection au VIH-1 (Greenspan and Greenspan 1992). La COP peut prendre plusieurs formes cliniques, chacune causant des affections distinctes.

### 1.3.1 La candidose pseudomembraneuse

Il s'agit de la forme de COP communément appelée muguet. Le diagnostic est souvent basé sur l'apparence des lésions blanches ou jaunâtres qui sont caractéristiques. Ces plaques sont retrouvées dans la cavité buccale et peuvent être délogées pour laisser apparaître une muqueuse rouge, parfois ensanglantée (Reichart 2003). L'infection aiguë entraîne une sensation de brûlement diffuse dans la cavité orale. La présence d'hyphes permet de discriminer l'infection d'une colonisation commensale par *C. albicans* (Weinert, Grimes et al. 1996). Cette forme de COP est la plus répandue chez les patients atteints du VIH-1 dont les décomptes de lymphocytes T CD4 circulants sont inférieurs à 200 cellules/  $\mu\text{l}$  (Liu, Liu et al. 2006).

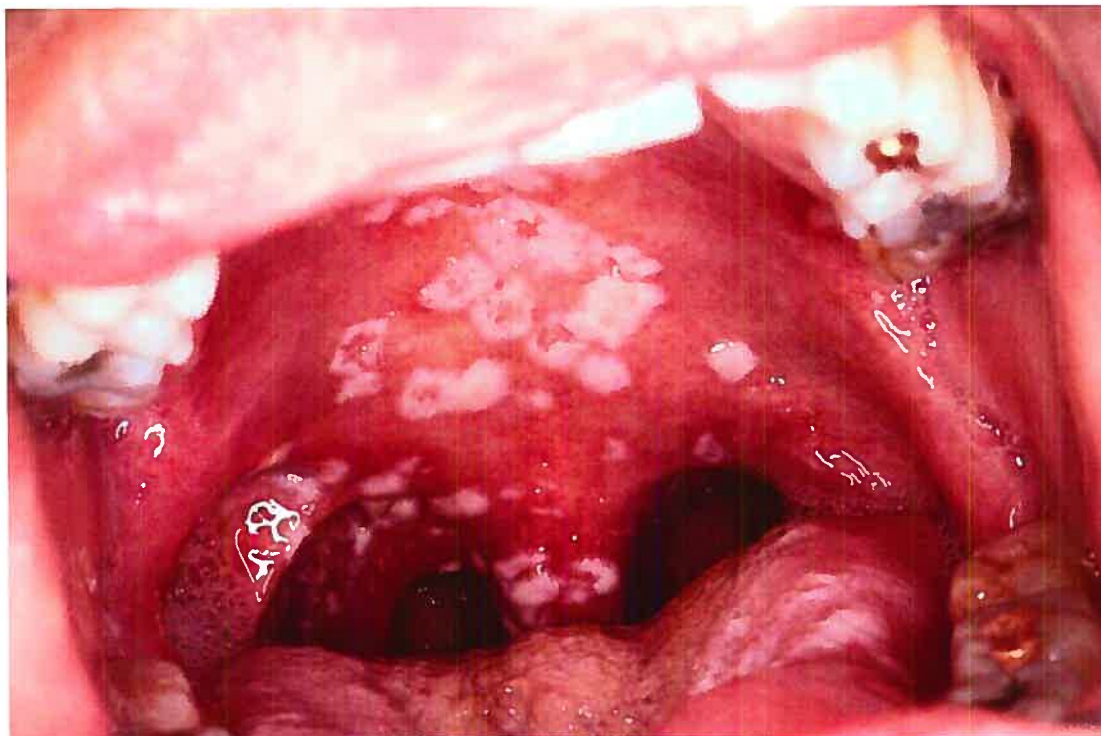


Figure 2 : La candidose pseudomembraneuse

### 1.3.2 La candidose érythémateuse

La candidose érythémateuse peut elle aussi se retrouver sur toutes les muqueuses de la cavité buccale mais est typiquement observée sur le palais ou sur la région dorsale de la langue (Lopez-De-Blanc, Salati-De-Mugnolo et al. 2002). Elle est caractérisée par l'apparition de plaques rougeâtres. Il est plus difficile de diagnostiquer ce type d'infection et le prélèvement de biopsies s'avère souvent nécessaire (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). Cette forme de COP affecte particulièrement les patients en phase précoce de SIDA, alors que le nombre de lymphocytes T CD4 circulants se situe entre 200 et 499 cellules par  $\mu\text{l}$  (Liu, Liu et al. 2006). Malgré certaines études contradictoires (Dodd, Greenspan et al. 1991) (Nielsen, Bentsen et al. 1994), il semble que l'apparition de cette infection soit moins utile en tant qu'outil prédictif du développement du VIH-1 que la candidose

pseudomembraneuse (Robinson, Challacombe et al. 1997). Cette COP est, de plus, généralement moins prévalente dans la cavité buccale que la candidose pseudomembraneuse.



Figure 3 : La candidose érythémateuse

### 1.3.3 Autres formes de COP

De nombreux cas de chéilite angulaire (perlèche) sont dénombrés chez les patients atteints du VIH-1. Ce type d'infection est caractérisé par des fissures et des rougeurs localisées aux commissures des lèvres (Reichart 2003). Traditionnellement associée à une malnutrition, cette COP est toutefois significativement associée à l'infection au VIH-1 (Adurogbangba, Aderinokun et al. 2004). Sa présence est souvent associée à une candidose intra-orale, pseudomembraneuse et/ou érythémateuse. Finalement, la candidose oropharyngée se manifeste parfois en tant que chéilite exfoliative ou sous forme d'hyperplasie.

La candidose oesophagienne est quant à elle une complication assez commune chez les individus infectés au VIH-1 (Mocroft, Oancea et al. 2005). Elle s'accompagne fréquemment de dysphagie et de douleurs à la poitrine (Mocroft, Oancea et al. 2005). Cette infection est particulièrement accablante pour les patients puisqu'elle entraîne des difficultés à se nourrir convenablement (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004).

La prévalence de la candidose oropharyngée a considérablement régressé depuis l'arrivée sur le marché de traitements anti-rétroviraux efficaces (HAART)(de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). Ceci est en contradiction avec des résultats suggérant une augmentation de certains désordres cutanés tels que la dermatite séborrhéique (Zancanaro, McGirt et al. 2006). Il a été démontré que l'utilisation d'un traitement contenant un inhibiteur de protéase entraîne une diminution significative de prévalence des COPs, de fréquence d'apparition des COPs, de charge buccale de *C. albicans* ainsi que de candidose eosophagienne (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). Il semble que ce soit l'amélioration des fonctions du système immunitaire des patients qui permet d'éviter temporairement l'apparition des COPs (Arribas, Hernandez-Albujar et al. 2000). Par ailleurs, il a été démontré que l'augmentation des lymphocytes T CD4 provoquée par HAART soit nécessaire mais non pas suffisante pour protéger les individus infectés au VIH-1 d'une colonisation par *Candida* (Yang, Lo et al. 2006). La régression de la prévalence de la candidose oropharyngée chez les patients traités à l'aide de HAART a mené à une diminution de l'utilisation d'antifongiques depuis 1994 (Mocroft, Oancea et al. 2005).

## Chapitre 2 : Système immunitaire des muqueuses et défenses à l'égard de *C. albicans*

### 2.1 Immunité innée

L'immunité innée est constituée des mécanismes de défense non spécifiques de l'hôte (Paul 2003). Il peut s'agir de barrières physiques, comme la peau ou les muqueuses, ainsi que de protéines sécrétées ou de cellules effectrices. Dans le contexte de la COP, c'est la muqueuse buccale qui agit en tant que première ligne de défense de l'organisme envers *C. albicans*. De nombreuses molécules solubles antimicrobiennes sont de plus présentes dans la salive et à la surface de l'épithélium (Calderone, 2002). Finalement, plusieurs types cellulaires jouent un rôle primordial en s'attaquant directement au champignon ou en recrutant efficacement les cellules effectrices.

#### 2.1.1 La muqueuse buccale

La muqueuse buccale est composée de deux couches tissulaires majeures, soit l'épithélium squameux stratifié et la lamina propria (Nanci, 2003). L'épithélium peut être kératinisé ou non, selon la région. L'épithélium kératinisé est formé de quatre strates soit, de la plus profonde à la plus superficielle, la *stratum germinativum*, la *stratum spinosum*, la *stratum granulosum* et la *stratum corneum*. L'épithélium non-kératinisé présente aussi quatre strates différentes, mais la *stratum intermedium* et la *stratum superficiale* remplacent les *stratum granulosum* et *corneum* (Berkovitz, 1992). C'est dans les deux premières strates où sont généralement situées les cellules progénitrices de l'épithélium. Lorsque les cellules migrent vers les strates superficielles, elles s'engagent alors dans un processus de maturation menant à la kératinisation ou à la non-kératinisation. Dans les deux cas, les cellules subissent des modifications d'ordre morphologique, produisent plus de protéines de structure,

présentent de plus en plus d'organelles et produisent du nouveau matériel intracellulaire (Nanci, 2003).

La lamina propria est constituée de tissu conjonctif et est située entre la couche superficielle de la muqueuse, l'épithélium, et la sous-muqueuse. Trois types distincts de muqueuses sont retrouvés à l'intérieur de la cavité buccale humaine : la muqueuse bordante, la muqueuse masticatoire et la muqueuse spécialisée. La muqueuse bordante couvre environ 60% de la cavité buccale, et est concentrée principalement à l'intérieur des joues, sur le palais mou, en dessous de la langue et au plancher de la bouche (Nanci, 2003). Elle est habituellement non-kératinisée. La muqueuse masticatoire, quant à elle kératinisée, se situe sur les gencives ainsi qu'au palais dur. La muqueuse spécialisée est présente sur les lèvres, à la jonction de la peau et de la muqueuse bordante, ainsi que sur la langue, là on l'on retrouve les papilles gustatives (Berkovitz, 1992). Ces régions sont aussi kératinisées.

Les kératines sont en fait le nom donné à une trentaine de protéines structurales formant des filaments; certaines sont présentes même dans les cellules de tissus non-kératinisés (Nanci, 2003). Ces filaments intracellulaires relient les desmosomes, permettant ainsi une cohésion avec les cellules adjacentes. Les cellules épithéliales produisant les kératines sont appelées kératinocytes, par opposition aux autres types cellulaires présents dans l'épithélium oral. On y retrouve par exemple des mélanocytes (cellules responsables de la pigmentation), des cellules de Langherhans, des cellules de Merkel ainsi que des cellules immunitaires recrutées lors de l'inflammation (Nanci, 2003). L'étanchéité créée par les jonctions étroites entre les cellules de l'épithélium buccal constitue une barrière efficace contre les agents infectieux. De même, une desquamation adéquate de la couche superficielle (stratum corneum ou superficielle) est nécessaire afin d'éliminer efficacement les pathogènes adhérents.



## 2.1.2 Protéines salivaires

Certaines protéines salivaires présentent une activité fongicide envers *C. albicans*, formant ainsi une barrière chimique. Leurs modes d'action sont variés afin d'augmenter l'efficacité de la réponse innée et contrer les mutants éventuels. Par ailleurs, ces protéines antimicrobiennes forment une pellicule à la surface de la muqueuse, ce qui peut favoriser l'adhésion de *C. albicans* (Bosch, Turkenburg et al. 2003). Voilà celles qui sont le plus fortement impliquées dans la défense de l'hôte contre *C. albicans*.

### **Lysozyme**

Le lysozyme est la première protéine découverte à la surface de la peau et des muqueuses de l'homme ayant des propriétés microbicide (Harder and Schroder 2005). Dans la muqueuse buccale, il peut être produit par les kératinocytes, les macrophages, les monocytes et les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) (Niyonsaba and Ogawa 2005). Le lysozyme agit de façon dose-dépendante afin de contrer *C. albicans*; à faible dose il diminue la concentration et l'activité des Saps alors qu'à forte dose, il tue *Candida* (Wu, Samaranayake et al. 1999). On sait que cette protéine est de plus impliquée dans l'augmentation de la phagocytose par les PMNs et les macrophages (Ibrahim, Matsuzaki et al. 2001) tout en jouant un rôle dans le contrôle de l'inflammation (Ganz, Gabayan et al. 2003). *C. albicans* est aussi plus sensible au lysozyme lorsque qu'il est exposé à des agents antifongiques (Anil and Samaranayake 2002).

### **Lactoferrine**

La lactoferrine est une glycoprotéine synthétisée par les cellules épithéliales et les PMNs qui est retrouvée abondamment dans la salive (Nuijens, van Berkel et al.

1996). Son activité microbicide est située dans la partie N-terminal de la protéine (Lupetti, Paulusma-Annema et al. 2000). La lactoferrine peut agir de diverses façons, soit par action directe sur *C. albicans* en perméabilisant sa membrane et provoquant une perte d'ATP, ou alors en amplifiant la réponse immunitaire à médiation cellulaire de l'hôte (Takakura, Wakabayashi et al. 2004). De plus, elle séquestre le fer disponible dans l'environnement, privant les microorganismes de cette ressource (Lupetti, Paulusma-Annema et al. 2000). Chez la souris, il a été démontré que la lactoferrine administrée oralement prévient la candidose systémique (Abe, 2000).

### **Calprotectine**

La calprotectine est une protéine produite par les granulocytes, les monocytes, les macrophages et par les cellules épithéliales de la muqueuse buccale (Kleinegger, Stoeckel et al. 2001). La protéine compétitionne avec les microorganismes pour le zinc, ce qui prive *C. albicans* d'un nutriment essentiel (Lulloff, Hahn et al. 2004). Il a été démontré, *in vitro*, que la calprotectine inhibe la transformation phénotypique de *C. albicans* de la forme levure à la forme hyphé (Murthy, Lehrer et al. 1993).

### **Inhibiteurs de protéase leucocytaire sécrétoire**

Les inhibiteurs de protéase leucocytaire sécrétoire (SLPI pour *Secretory Leukocyte Protease Inhibitor*) sont des protéines cationiques non-glycosylées comportant deux domaines aux fonctions enzymatiques distinctes (Doumas, Kolokotronis et al. 2005). Celles-ci sont retrouvées dans plusieurs fluides corporels humains, dont la salive (Chattopadhyay, Gray et al. 2004). La portion C-terminale des SLPI aurait pour rôle principal le maintien de l'intégrité des tissus en inhibant la production d'élastase et autres protéases. La partie N-terminale présenterait plutôt des propriétés fongicides (Doumas, Kolokotronis et al. 2005). La production de protéases par les levures serait de plus inhibée grâce aux SLPI (Tomee, Hiemstra et al. 1997).

## Défensines

Les défensines sont des peptides cationiques non-glycosylés contenant une arginine comme premier résidu cationique (De Smet and Contreras 2005). On distingue 2 types de défensines, c'est-à-dire les  $\alpha$ -défensines et  $\beta$ -défensines. Les  $\alpha$ -défensines sont produites par les neutrophiles, conservées dans les granules azurophiles puis relâchées lors de l'inflammation (Ali, Niissalo et al. 2005). Les  $\beta$ -défensines sont reconnues comme appartenant aux systèmes de défense inné et acquis puisqu'elles agissent en tant qu'agent microbicide et sont responsables de chimiotactisme (Joly, Maze et al. 2004). Certaines  $\beta$ -défensines sont présentes constitutivement dans la salive alors que d'autres sont sécrétées en réponse à un stimulus microbien ou en présence de cytokines. h-BD2 et h-BD3, des membres de la famille des  $\beta$ -défensines, ont démontré des effets fongicides envers *C. albicans* (Niyonsaba and Ogawa 2005).

## Histatines

Les histatines sont de petites protéines cationiques riches en histidine (De Smet and Contreras 2005). Elles sont sécrétées par les glandes submandibulaires, sublinguales et parotidiennes (Ahmad, Piludu et al. 2004). L'histatine 5 est le membre de la famille des histatines ayant le plus grand potentiel fongicide à l'égard de *C. albicans*. Il s'agit d'une petite protéine de 24 acides aminés résultant du clivage de l'histatine 3, une protéine sécrétée (Vylkova, Li et al. 2006). L'histatine 5 se lie à certaines protéines spécifiques de la paroi cellulaire de *C. albicans*, est internalisée et cause une augmentation des niveaux d'espèces réactives de l'oxygène intracellulaires, une diminution de l'ATP, une diminution du volume de la cellule puis finalement un arrêt du cycle cellulaire (Li, Reddy et al. 2003).

## Peroxydases

Les deux types de peroxydases le plus fréquemment rencontrées dans la cavité buccale sont la peroxydase salivaire et la myéloperoxydase. Leurs modes d'action microbicides sont nombreux et varient selon la bactérie ou le champignon ciblé (Ihalin, Loimaranta et al. 2006). Cependant, leur effet envers *C. albicans in vivo* n'a pu être démontré dû aux concentrations importantes de phosphate retrouvées dans la salive, ce qui inhibe l'effet des peroxydases (Lenander-Lumikari 1992).

### 2.1.3 Kératinocytes

Les kératinocytes constituent la majeure partie des cellules retrouvées dans l'épithélium de la muqueuse buccale. En plus de former une barrière physique afin de contrer la colonisation par *C. albicans*, on sait maintenant que ces cellules jouent des rôles précis et cruciaux afin d'éliminer le champignon. La desquamation, qui consiste en l'exfoliation de la couche superficielle de l'épithélium, permet le transport de *C. albicans* adhérent à la muqueuse buccale vers l'estomac. La desquamine est une protéine de surface des kératinocytes impliquée dans la cohésion intercellulaire et la desquamation (Brysk, Bell et al. 1991). Il a été démontré que l'IFN- $\gamma$  a la propriété d'induire une hausse d'expression de desquamine, entraînant du même coup un renouvellement accru des cellules des couches superficielles (Brysk, Bell et al. 1991).

L'IFN- $\gamma$  est l'une des nombreuses cytokines produite par les kératinocytes de façon non-constitutive (Fujisawa, Kondo et al. 1997). En effet, ces cellules ont aussi la capacité de produire des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8 et TNF), certaines cytokines favorisant le recrutement de lymphocytes T (IL-7 et IL-15) ainsi que des immunomodulateurs aux effets antagonistes (IL-10 vs IL-12 et IL-18) (Grone 2002). Par ailleurs, les kératinocytes expriment à leur surface les récepteurs de l'IL-2, l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-17, et la liaison de ces ligands à leur agoniste assure la régulation de la transcription de nouvelles cytokines (Grone 2002). Ceci démontre

une réelle interaction bidirectionnelle entre les kératinocytes stimulés par la présence d'un pathogène et les cellules du système immunitaire. Il a récemment été démontré dans un modèle de candidose sur épithélium vaginal reconstitué que *C. albicans*, via l'action des protéases de la famille des Saps, induit l'expression accrue d'IL-1 $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-6, d'IL-8, d'IL-10, de GM-CSF, d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  (Schaller, Korting et al. 2005). Ceci est cohérent avec les travaux précédents des mêmes auteurs, qui indiquaient entre autres une augmentation d'expression d'IL-1 $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$ , d'IL-8, de GM-CSF et de TNF- $\alpha$  par des kératinocytes provenant d'un épithélium de peau humaine infecté par *C. albicans* (Schaller, Mailhammer et al. 2002).

On croit que *Candida* arrive à activer les kératinocytes via sa liaison aux Pattern Recognition Receptors (PRRs) que ces cellules expriment à leur surface (Pivarcsi, Bodai et al. 2003). L'un de ces PRRs est un récepteur de mannose qui, lorsque lié aux polymères de mannose présents dans la paroi cellulaire de *C. albicans*, active les kératinocytes (Szolnoky, Bata-Csorgo et al. 2001). Ceux-ci expriment aussi à leur surface les Toll-Like Receptors (TLRs) 2 et 4 (Pivarcsi, Bodai et al. 2003). Les TLRs sont une famille de récepteurs transmembranaires impliqués dans la reconnaissance de pathogènes unicellulaires (Paul 2003). Le TLR-2 est reconnu pour s'associer aux peptidoglycanes, aux lipoprotéines, au lipoarabinomannane et au zymosan alors que le TLR-4 est plutôt spécifiquement lié au LPS (Paul 2003). Il a été démontré que *C. albicans* lie le TLR-2, induisant ainsi une augmentation de la production d'IL-8 par les kératinocytes (Pivarcsi, Bodai et al. 2003). Certaines études démontrent de plus un rôle du TLR-4 dans la reconnaissance de *C. albicans* puisque l'utilisation d'un anticorps anti-TLR-4 nuit à l'activité fongicide des kératinocytes à l'égard de *C. albicans* (Pivarcsi, Bodai et al. 2003).

Les kératinocytes ont la capacité d'agir directement sur *C. albicans* de plusieurs façons. Tout d'abord, l'IL-8 est un inducteur de l'Inducible Nitric Oxide Synthase (Vazquez, Greenwell-Wild et al.) chez les kératinocytes (Bruch-Gerharz, Fehsel et al. 1996). L'expression de cette enzyme est nécessaire à la production d'oxyde nitrique (NO), molécule à laquelle *C. albicans* est sensible. Les kératinocytes

sont aussi impliqués dans la production de SLPI (Wingens, van Bergen et al. 1998), du peptide antibactérien LL-37 (Frohm, Agerberth et al. 1997) et de  $\beta$ -défensines (Harder, Bartels et al. 2001). D'une façon méconnue, les cellules épithéliales exercent de plus une activité fongicide lorsqu'ils entrent en contact direct avec *C. albicans* même si les kératinocytes ont été inactivés par fixation (Yano, Lilly et al. 2005).

#### 2.1.4 Cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans ont été visualisées pour la première fois dans la peau en 1868, par Paul Langerhans. Elles sont retrouvées dans la peau et les muqueuses, dérivent de la moëlle osseuse, expriment à leur surface les molécules du CMH-II et sont aptes à présenter les antigènes aux lymphocytes T (Paul 2003). Ces cellules sont considérées comme une sous-population de cellules dendritiques (DCs) immatures. Phénotypiquement, les cellules de Langerhans peuvent être identifiées par l'expression des marqueurs de surface CD1a, CD11c, E-cadherine et Langerine (Berger, Vasquez et al. 2006). Outre cette population, on retrouve aussi dans la peau les DCs dermales ainsi que certaines DCs plasmacytoïdes (Valladeau and Saeland 2005). Les cellules de Langerhans sont de lignée myéloïde, et leur différenciation à partir de monocytes est médiée par la présence de certains facteurs tels que le TGF- $\beta$ , le GM-CSF, l'IL-4 et le Notch ligand  $\delta$ -1 (Hoshino, Katayama et al. 2005). Le recrutement de progéniteurs de cellules de Langerhans survient lors de l'inflammation, entre autres grâce au récepteur CCR6 qu'elles expriment et qui lie la chimiokine MIP3a sécrétée par les kératinocytes (Koch, Kohl et al. 2006).

Dans la muqueuse buccale, les cellules de Langerhans ont pour principale fonction de capter les antigènes, par phagocytose ou macropinocytose (Berger, Vasquez et al. 2006). En tant que cellules présentatrices d'antigènes, elles migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques afin de présenter les peptides apprêtés aux lymphocytes T. Les cellules de Langerhans ont la capacité d'effectuer de la présentation croisée, ce qui signifie qu'elles peuvent activer à la fois les lymphocytes

T CD4 et CD8, via les molécules du CMH-II et I respectivement (Banchereau, Briere et al. 2000). Par ailleurs, elles agissent aussi en activant certaines cellules du système immunitaire telles que les lymphocytes T Natural Killer (Feigal, Katz et al.) et les lymphocytes T  $\gamma\delta$  en sécrétant de l'IL-12 ou de l'IFN (Berger, Vasquez et al. 2006).

Les DCs reconnaissent *C. albicans* par plusieurs PRRs, dont le récepteur de mannose-fucose ainsi que les TLRs 2 et 4 (Pietrella, Bistoni et al. 2006). Dans un modèle murin de candidose vaginal, il a été démontré que les cellules dendritiques présentes dans la muqueuse seraient impliquées dans l'immunorégulation de la réponse de l'hôte lors de l'infection à *C. albicans* (Leblanc, Barousse et al. 2006). Il semble en fait que le récepteur impliqué dans la reconnaissance de *C. albicans* par les DCs soit prédictif de la réponse enclenchée (protectrice vs régulatrice). Par exemple, il a été observé chez les DCs immatures dérivés de monocytes humains que la liaison de l'antigène dominant de *C. albicans* MP65 aux TLRs 2 et 4 favorise la maturation des DCs tout en entraînant une production accrue d'IL-6, d'IL-12 et de TNF- $\alpha$  (Pietrella, Bistoni et al. 2006). Une reconnaissance de l'antigène MP65 entraînerait donc principalement une réponse immunitaire cellulaire protectrice. Tel que décrit plus loin, la morphologie de *Candida* (levure vs hyphe) est aussi déterminante quant à la réponse induite par les DCs de la muqueuse (Kurzai, Schmitt et al. 2005).

### 2.1.5 PMNs

Les PMNs sont des granulocytes au noyau multilobé retrouvés principalement dans la circulation (40 à 50% des cellules du sang). Les précurseurs proviennent de la moelle osseuse, et les PMNs se différencient en myéloblastes et myélocytes avant d'achever leur maturation sous forme de neutrophiles pour être dirigés ensuite vers la circulation, d'où ils peuvent atteindre les sites d'inflammation (Paul 2003). Ainsi les neutrophiles sont habituellement absents de la muqueuse buccale saine. Ce sont par ailleurs les toutes premières cellules recrutées lors d'infections à *C. albicans* (Ashman and Papadimitriou 1995).

La migration des neutrophiles recrutés lors de l'infection à *C. albicans* jusqu'aux couches superficielles de l'épithélium de la muqueuse buccale requiert des interactions spécifiques avec les cellules épithéliales via leurs molécules de surface (Liu, Buhring et al. 2002). Certaines cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- $\alpha$  pourraient intervenir afin de favoriser la migration (Tosi, Hamedani et al. 1994). Les neutrophiles ont la capacité d'inhiber partiellement la croissance de *C. albicans* par un contact direct dans l'épithélium, ou même en demeurant à distance du champignon, le mécanisme sous-jacent étant la production de cytokines (IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$ ) (Schaller, Boeld et al. 2004).

Les neutrophiles sont importants dans la résistance aux infections à *C. albicans*. Il a d'ailleurs été démontré que la neutropénie augmente la susceptibilité de l'hôte à l'infection par *Candida* (Dongari-Bagtzoglou and Fidel 2005). La phagocytose ainsi que l'activité fongicide des neutrophiles à l'égard des conidies de *C. albicans* ont été démontrées (Marquis, Lewandowski et al. 2006). Les hyphes de *C. albicans* peuvent de même être inactivées par les neutrophiles, en relâchant la myéloperoxydase (Diamond, Clark et al. 1980). Par ailleurs, ces cellules causent aussi des dommages au champignon en sécrétant à la surface de l'épithélium la lactoferrine contenue dans leurs granules secondaires (Paul 2003).

### 2.1.6 Macrophages

Les macrophages résidents retrouvés dans les tissus sont des cellules de lignée myéloïde et dérivent des monocytes circulants (Paul 2003). Ils sont considérés comme les cellules effectrices par excellence dans la défense de l'hôte. Les macrophages sont impliqués dans la destruction des pathogènes, la médiation de la réponse inflammatoire, la présentation des antigènes aux lymphocytes ainsi que la phagocytose des cellules apoptotiques. Chez l'homme, ils ne forment pas une population homogène et on reconnaît, entre autres, les macrophages alvéolaires,



plusieurs sous-populations de macrophages du système nerveux central, les cellules de Kupffer dans le foie, les macrophages de la rate, les macrophages résidents des tissus ainsi que les macrophages dérivés de monocytes inflammatoires (Gordon and Taylor 2005). L'expression de leurs molécules de surface varie selon leur disposition et leur degré de maturation mais généralement, les macrophages sont reconnus comme portant les marqueurs CD4, CD14, CMH-II, le récepteur de fragments Fc, F4/80 (chez la souris seulement) et CD11b (Mac-1) (Lai, Alaverdi et al. 1998).

Les macrophages résidents de la muqueuse buccale sont situés dans la lamina propria (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). Les macrophages dérivés de monocytes sont quant à eux recrutés lors de l'inflammation et on les retrouve dans la muqueuse buccale environ 5 ou 6 jours après la primo-infection par *C. albicans* (Lacasse, Fortier et al. 1990). Ces macrophages expriment plusieurs PRRs, entre autres le récepteur du mannose, le CD14 (récepteur liant le lipopolysaccharide), ainsi que les TLRs (Janeway 2003). Dans le contexte de la candidose oropharyngée, les macrophages sont activés suite au relargage d'IFN- $\gamma$  par les kératinocytes, les cellules de Langerhans ou les neutrophiles (Vazquez-Torres and Balish 1997). En plus d'agir en tant que cellules présentatrices d'antigènes, les macrophages exercent une action directe sur le *Candida* via plusieurs mécanismes. Notons la phagocytose, la production d'intermédiaires réactifs de l'oxygène ainsi que de l'azote, de même que la production de lysozyme et de défensines. Parmi ces mécanismes antimicrobiens, la sécrétion de monoxyde d'azote (NO) et de peroxydite est unique aux macrophages, qui démontrent une forte activité anti-*Candida* (Vazquez-Torres and Balish 1997).

Les macrophages activés favorisent la résistance de l'organisme à *C. albicans* en produisant de nombreuses cytokines pro-inflammatoires. Dans une étude utilisant les monocytes du sang humain, il a été démontré que le contact avec *Candida* entraîne dès les six premières heures une expression accrue des gènes codant pour le TNF- $\alpha$ , l'IL1- $\beta$ , l'IL-6, certaines protéines inflammatoires des macrophages (MIP),

ainsi que pour des récepteurs liant le fer impliqués dans la génération de réactifs intermédiaires de l'oxygène et de l'azote (Kim, Choi et al. 2005).

### 2.1.7 Cellules NK

Les cellules « tueuses », bien que de lignée lymphocytaire, appartiennent au système immunitaire inné. Celles-ci sont surtout impliquées dans la défense contre les cellules tumorales, les virus ainsi que certains pathogènes intracellulaires (Janeway 2003). Par ailleurs, il a été démontré que les NK n'ont peu ou pas d'effet sur la forme hyphe de *C. albicans* (Beno, Stover et al. 1995). De plus, on sait maintenant que *Candida*, sous forme levure ou hyphe, a la capacité d'inhiber la production d'IFN- $\gamma$  par les NK, via un mécanisme indépendant de la reconnaissance par les TLRs (Murciano, Villamon et al. 2006).

## 2.2 Immunité acquise

### 2.2.1 Lymphocytes B

Les lymphocytes B proviennent des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse. Leur développement se déroule dans ce site jusqu'au stade de cellule B immature, alors qu'ils expriment des immunoglobulines M (IgM) à leur surface. Ces lymphocytes sont ensuite dirigés vers les organes lymphoïdes périphériques, où ils subissent une dernière sélection puis deviennent des cellules naïves exprimant aussi des immunoglobulines D (IgD) (Janeway 2003). Les lymphocytes B ayant rencontré leur antigène spécifique se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps ou en cellules B mémoire. Ce sont les cellules productrices des immunoglobulines A retrouvées dans la salive.

Il a été démontré que les lymphocytes B sont présents en très faible quantité dans l'épithélium de la muqueuse buccale normale (environ 0,1 cellule/mm<sup>2</sup>) (Chiang, Wu et al. 2002). Leur rôle dans la défense de l'hôte lors de la COP n'est pas établi (Wagner, Vazquez-Torres et al. 1996). On sait maintenant que la composition en anticorps de la salive de patients présentant une COP n'est pas différente de celle de porteurs sains, suggérant un faible rôle de l'immunité humorale dans la défense mucosale contre *C. albicans* (Wozniak, Leigh et al. 2002). Par ailleurs, il semble que les souris déficientes en lymphocytes B soient incapables de survivre à une infection invasive à *Candida*, probablement par manque de cytokines régulatrices telles que l'IL-10 (Montagnoli, Bozza et al. 2003).

### 2.2.2 Lymphocytes T $\alpha\beta$

Les lymphocytes T, ayant aussi comme progéniteurs les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse, subissent les premières étapes de leur maturation dans le thymus. C'est à l'intérieur de cet organe lymphoïde primaire qu'ils prolifèrent, se différencient et sont sélectionnés pour la reconnaissance d'un antigène exogène (Paul 2003). On retrouve deux grandes classes de lymphocytes T, différenciées par l'expression à leur surface des molécules CD4 ou CD8. Outre ces marqueurs, les lymphocytes T  $\alpha:\beta$  expriment tous un récepteur de cellules T (TCR) constitué de deux chaînes polypeptidiques ( $\alpha$  et  $\beta$ ) liées entre elles par un pont disulfure (Janeway 2003). La grande majorité des lymphocytes T possèdent un TCR  $\alpha\beta$ .

Les cellules T sont distribuées aléatoirement dans l'épithélium de la muqueuse buccale. Chez l'homme, une prépondérance des lymphocytes T CD8 versus les lymphocytes T CD4 y est observée dans un ratio d'environ 2 :1 (van Loon, Krieg et al. 1989). L'importance des cellules T CD4 dans la défense de l'hôte contre *C. albicans* est confirmée par la corrélation directe notée entre l'apparition de la COP

chez les patients VIH+ et la diminution du nombre de lymphocytes T CD4 (Fidel 2002). Dans un modèle murin, l'éradication complète du champignon tant au niveau oral que gastro-intestinal a été démontrée comme étant dépendante des cellules T CD4 (Ashman, Farah et al. 2004).

Chez les patients HIV+ présentant une COP, un afflux de lymphocytes T CD8 à la muqueuse buccale est observé (Myers, Leigh et al. 2003). Par ailleurs, dans un modèle de souris utilisé au laboratoire et exprimant le génome tronqué du VIH-1, il a été démontré que l'absence de lymphocytes T CD8 provoque une augmentation de la charge buccale de *C. albicans* dans le contexte d'une COP (Marquis, Lewandowski et al. 2006). La fonction exacte de ces lymphocytes dans le cadre de l'infection à *Candida* demeure méconnue, cependant une augmentation des cytokines associées aux cellules T CD8 a été observée dans la muqueuse buccale portant des lésions dues à *C. albicans* (Lilly, Hart et al. 2004), suggérant un rôle pour ces cellules au niveau de l'activation des phagocytes (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004).

### 2.2.3 Lymphocytes T $\gamma\delta$

Les lymphocytes T  $\gamma\delta$  diffèrent de ceux présentés ci-dessus par les chaînes polypeptidiques composant leur TCR. Ces cellules représentent de 5 à 10% des lymphocytes retrouvés en périphérie (Paul 2003). Les cellules T  $\gamma\delta$  intraépithéliales montrent une diversité limitée quant à leur TCR et ne reconnaissent généralement pas les antigènes via la présentation par le CMH-II (Janeway 2003). Il a été démontré *in vitro* que la présence de ces lymphocytes favorise la production de NO par les macrophages (Jones-Carson, Vazquez-Torres et al. 1995). Ils pourraient de plus exercer une activité cytotoxique par contact direct avec les cellules de *C. albicans* (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). Par ailleurs, les lymphocytes T  $\gamma\delta$  sont souvent reconnus pour jouer un rôle régulateur afin de contrôler les réponses immunitaires excessives (Janeway 2003).

## 2.3 Facteurs de virulence de *C. albicans*

Contrairement à certains pathogènes spécialisés présentant un seul facteur de virulence majeur afin d'infecter l'hôte, *C. albicans* compte sur l'expression de nombreux gènes aux fonctions différentes afin d'adhérer, de coloniser et d'envahir peau et muqueuses (Kumamoto and Vines 2005). Voici certaines des habiletés utiles à *C. albicans* dans le contexte de la COP.

### 2.3.1 La transformation morphologique

La capacité de passer de la forme levure à la forme hyphes que possède *C. albicans* est très importante quant à sa virulence chez l'hôte. Dans un modèle murin, il a été démontré que les souches mutantes quant aux protéines régulatrices de la filamentation sont avirulentes (Lo, Kohler et al. 1997). Par ailleurs, on sait que les souches présentant une hyperfilamentation ne sont pas favorisées chez l'hôte, suggérant que l'envahissement des tissus puisse être influencé par la capacité de *C. albicans* à se transformer, mais ce de façon bidirectionnelle (Yang 2003).

On croit que la filamentation intervient dans la pénétration des tissus. En fait, les hyphes exerceraient une force mécanique permettant la déformation des cellules épithéliales afin d'envahir la muqueuse (Kumamoto and Vines 2005). La formation d'hyphes serait de plus importante afin de permettre au *C. albicans* phagocyté par les cellules épithéliales de s'évader et de progresser en endommageant le tissu (Kumamoto and Vines 2005). Il a été constaté que la production d'hyphes est dépendante du contact avec les cellules épithéliales (Kumamoto and Vines 2005). Par ailleurs, la filamentation est contrôlée parallèlement à l'expression d'autres gènes de virulence afin d'assurer une mise en commun des habiletés de *Candida* à infecter l'hôte.

### 2.3.2 Les Secreted Aspartic Proteinases (Saps)

Les Saps sont une famille de protéinases extracellulaires responsables de l'activité protéolytique de *C. albicans* (Calderone 2002). Il existe au minimum 10 Saps, dont 8 sont sécrétées alors que les Saps 9 et 10 agissent à titre de protéines membranaires (Schaller, Borelli et al. 2005). Afin d'augmenter le spectre d'action de ces protéinases, celles-ci sont actives à différents pH, ce qui les rend efficaces autant en milieu acide (vagin) que neutre (cavité buccale). Sap 2, l'une des protéinases associées à *Candida* les plus étudiées, possède une activité hydrolytique envers plusieurs substrats dont la matrice extracellulaire, la mucine, la lactoferrine, les inhibiteurs de protéases et les immunoglobulines. Les Saps sont aussi soupçonnées d'être impliquées dans l'attachement de *C. albicans* aux cellules épithéliales (Schaller, Borelli et al. 2005).

La pathogénicité de *Candida* a été corrélée à la production de Saps dans les modèles animaux. Plus particulièrement, les isolats de *C. albicans* provenant de patients infectés aux VIH-1 produisent généralement plus de protéinases que ceux obtenus chez des sujets non infectés, suggérant que les souches particulièrement virulentes soient sélectionnées chez les patients séropositifs (Sweet 1997). Comme la Pepstatine A agit en tant qu'inhibiteur des Saps, de nombreux groupes l'ont utilisée afin de démontrer les effets des protéinases dans le cadre de l'infection. Il a d'ailleurs été observé que l'injection intra-péritonéale de ce produit chez des souris neutropéniques permet l'obtention d'une protection efficace contre l'infection intranasale à *C. albicans* (Fallon, Bausch et al. 1997). De même, il a été constaté que les inhibiteurs de protéases contenus dans les traitements anti-rétroviraux tels que HAART pouvaient exercer une action directe sur les Saps, ce qui expliquerait en partie la diminution de prévalence de COP chez les patients VIH+ traités (Borg-von Zepelin, Meyer et al. 1999).

### 2.3.3 Les phospholipases

Les phospholipases exercent des activités intracellulaires ainsi qu'extracellulaires et représentent un facteur de virulence commun à plusieurs pathogènes bactériens et fongiques (Schaller, Borelli et al. 2005). Il existe quatre types de phospholipases décrites, soit PLA, PLB, PLC et PLD. On associe à *C. albicans* l'expression de PLB extracellulaire ainsi que de PLC et PLD intracellulaires (Schaller, Borelli et al. 2005). Le rôle principal des phospholipases sécrétées est la lyse des cellules par digestion des phospholipides membranaires (Arai, Sugita et al. 2004). On a par ailleurs constaté une activité des phospholipases au niveau de la pénétration des cellules épithéliales, de l'adhésion et de la transduction de signal chez l'hôte (Schaller, Borelli et al. 2005). Il a été démontré que des mutants n'exprimant pas PLB voyaient leur virulence significativement réduite dans le cadre d'une candidose systémique (Leidich, Ibrahim et al. 1998).

### 2.3.4 L'adhérence

L'une des premières étapes de la COP est la colonisation de la muqueuse buccale. Celle-ci est dépendante de l'adhérence de *C. albicans* et de la cavitation créée à la surface des cellules épithéliales (Kumamoto and Vines 2005). Les souches adhérentes de *C. albicans* ont été démontrées comme étant plus virulentes que les souches non-adhérentes (Hoyer 2001). Afin d'assurer l'attachement, *Candida* exprime de nombreuses molécules d'adhésion. Les adhésines de *C. albicans* sont habituellement des polysaccharides ou des glycoprotéines (Calderone 2002). *Candida* peut lier la fibronectine présente dans la matrice extracellulaire des cellules de mammifère via entre autres une mannoprotéine inductible en présence d'hémoglobine (Yan, Rodrigues et al. 1998). Plusieurs autres adhésines exercent des fonctions plus ou moins détaillées à ce jour, telles que les protéines MP58 et MP66, les adhésines fucosyl-lectine, les mannoprotéines ainsi que les acides sialiques (Calderone 2002). La famille des agglutinin-like sequences (Kim, Choi et al.) a retenu l'attention de

nombreux chercheurs. Les gènes des ALS ont été décrit tout d'abord chez *C. albicans*, et on en compte aujourd'hui neuf membres (Hoyer 2001). ALS1 semble être l'homologue de la glycoprotéine d'adhésion  $\alpha$ -agglutinine retrouvée chez *Saccharomyces cerevisiae* (Hoyer, Scherer et al. 1995). Finalement, la protéine Hwp1 joue un rôle dans l'établissement du contact entre *C. albicans* et les cellules épithéliales en mimant la transglutaminase produite par les cellules de l'hôte, agissant ainsi comme substrat nécessaire à l'adhésion (Staab, Bahn et al. 2004).

### **Chapitre 3 : Pathogénèse de la COP chez les patients infectés au VIH-1**

#### 3.1 Le VIH

##### 3.1.1 Pathogénèse et épidémiologie

Le Virus d'Immunodéficience Humaine (VIH) a été découvert en 1982, et c'est en 1983 qu'on l'a associé au Syndrome d'ImmunoDéficience Acquise, le SIDA (Paul 2003). Il s'agit d'un lentivirus, très semblable au virus d'immunodéficience simien qui infecte plusieurs primates non-humains (Kolegraff, Bostik et al. 2006). Cette famille cause des infections chroniques avec développement de la pathologie lors des dernières étapes de la maladie (Paul 2003). Le VIH est généralement transmis lors de relations sexuelles, lors d'échanges d'instruments liés à l'utilisation de drogues injectables ou par transmission verticale, au moment de l'accouchement ou pendant l'allaitement (Curran, Jaffe et al. 1988).

Si le VIH entraîne une primo-infection aiguë, c'est toutefois généralement plusieurs années plus tard que les symptômes associés au SIDA apparaissent. En effet, on observe chez seulement environ la moitié des patients une maladie similaire à la grippe dans les premières semaines suivant l'entrée du VIH (Janeway 2003).



Cette primo-infection est caractérisée par une chute drastique du nombre de lymphocytes T CD4 (d'environ 1200 à moins de 500 cellules/ $\mu$ L de sang). Ces taux remontent ensuite alors qu'une immunité adaptative se développe et limite la virémie (Janeway 2003). Une période de latence est alors normalement observée et peut s'étendre sur plusieurs années. La fonction et le nombre de lymphocytes T CD4 décline progressivement pendant ce temps, de façon inversement proportionnelle à la virémie. Les signes cliniques du SIDA apparaissent finalement lorsque le nombre de lymphocytes T CD4 descend sous la barre des 200 cellules/ $\mu$ L de sang (Paul 2003). Dès lors, on observe une susceptibilité accrue aux infections opportunistes, au développement de cancers (ex : sarcome de Kaposi) et d'encéphalopathies ainsi qu'un amaigrissement des patients (Paul 2003). En l'absence de thérapie antirétrovirale, l'issue de la maladie est généralement le décès.

Le SIDA est présentement l'une des 10 maladies les plus répandues au monde (Lopez, Mathers et al. 2006). L'Organisation des Nations Unies chiffrait à 39 millions le nombre de personnes infectées par le VIH en 2005. La prévalence d'infection atteindrait 12% chez les 15-49 ans dans la population africaine subsaharienne, là où l'épidémie est la plus criante (ONU 2006). Par ailleurs, dans de nombreux pays africains où la prostitution est importante, on observe aujourd'hui une proportion d'individus infectés plus grande chez les femmes que chez les hommes (Stover, Walker et al. 2006).

### 3.1.2 Mécanismes d'entrée du virus

Le VIH infecte les cellules exprimant la molécule de surface CD4, via la liaison de ce récepteur à la protéine de membrane gp120 (Kwong, Wyatt et al. 1998). Deux molécules de costimulation sont nécessaires à la fusion du virus dans la cellule hôte, soit les récepteurs CCR5 et CXCR4, qui permettent l'entrée du VIH dans les macrophages et lymphocytes T CD4, respectivement (Greene and Peterlin 2002). Les cellules dendritiques, qui sont souvent les premières cellules immunitaires à

rencontrer le virus dans les muqueuses, ont quant à elles la capacité de lier le gp120 directement par une lectine de type C appelée DC-SIGN. Cette liaison de haute affinité provoque l'internalisation du VIH dans un compartiment acide puis déclenche la migration de la cellule dendritique vers les ganglions lymphatiques, où se déroule la présentation du virus aux lymphocytes T CD4 (Kwon, Gregorio et al. 2002). C'est lors du contact entre les DC et les lymphocytes T CD4 que ceux-ci sont infectés par le virus, initiant alors les cycles de réplication virale. Parmi les réservoirs du virus chez l'hôte, on note les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4 et les cellules microgliales du système nerveux central (Paul 2003).

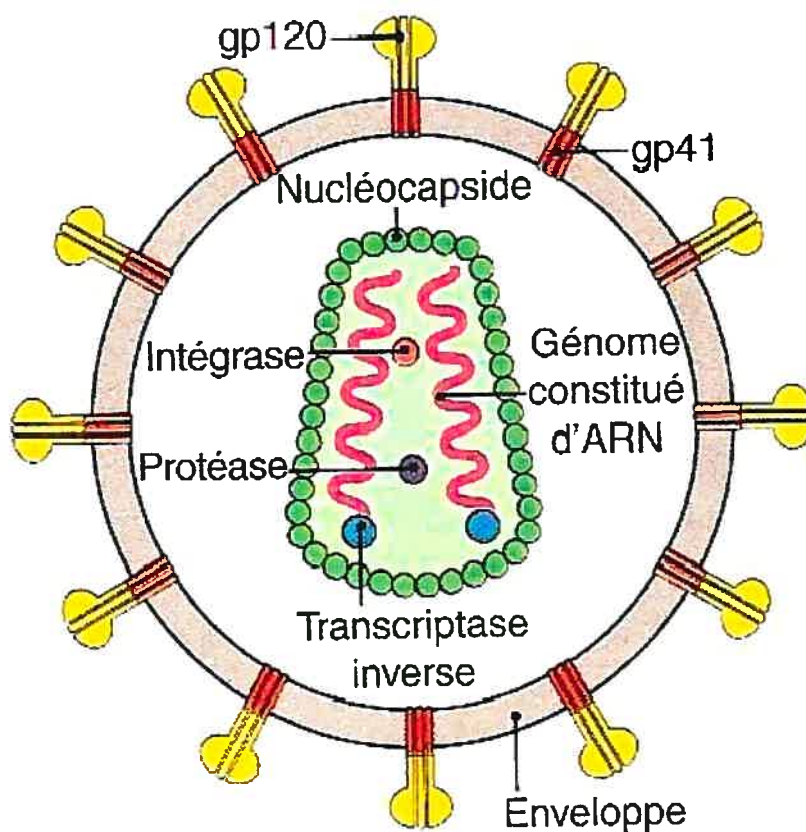


Figure 4 : Le virus de l'immunodéficience humaine (Janeway 2003)



La protéine Vif (figure 5) a été identifiée comme jouant un rôle au niveau de l'infectiosité du virus. Vpr (figure 5) est quant à elle responsable du transport de l'ADN vers le noyau. Elle est de plus impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire de la cellule hôte et facilite l'infection des macrophages. La protéine Vpu (figure 5) induit la dégradation de la molécule CD4 à l'intérieur de la cellule et est requise au niveau du relarguage des virions. Finalement, Nef (figure 5) est un facteur de régulation négative qui favorise la réduction d'expression de CD4 et des CMH-I et CMH-II à la surface des cellules. Il agit de plus au niveau de l'apoptose des cellules, de l'infectiosité des virions et de l'état d'activation cellulaire. Dans un modèle murin, il a été démontré que seule l'expression de Nef dans les cellules exprimant le CD4 à leur surface est suffisante pour induire une maladie semblable au SIDA (Hanna, Priceputu et al. 2006).

### 3.2 Perturbations des défenses de l'hôte à l'égard de *C. albicans*

#### 3.2.1 Réponse à médiation humorale

Dans la cavité buccale, le mécanisme principal de défense à médiation humorale est la sécrétion dans la salive d'anticorps IgA. Alors qu'on observe surtout une diminution du nombre d'IgA2 chez les patients infectés au VIH, tous les types d'IgA semblent diminués chez les patients en phase SIDA (Challacombe and Naglik 2006). On croit que la présence d'IgA pourrait être protectrice à l'égard de *C. albicans* puisque leur concentration est accrue chez les patients souffrant de COP (cohorte non-infectées au VIH-1) (Epstein, Kimura et al. 1982), par contre des études plus récentes n'ont pu établir clairement le rôle de ces anticorps contre *Candida* (Farah and Ashman 2005). Il a été suggéré que l'augmentation des IgA anti-*Candida* retrouvés dans la salive pourrait être une conséquence de l'infection plutôt qu'un moyen de défense efficace (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004).

### 3.2.2 Réponse à médiation cellulaire

Lors de l'infection au VIH, la concentration sérique des lymphocytes T CD8 diminue, et le remplacement de ces cellules se fait de façon plus rapide (Herbein, Mahlkecht et al. 1998). Ceci est causé par une augmentation de l'apoptose de ces cellules liée à la stimulation des macrophages par le virus. Par ailleurs, on observe au niveau de la muqueuse buccale une accumulation de lymphocytes T CD8 chez les patients infectés au VIH et présentant une COP, démontrant que leur recrutement n'est pas perturbé par le VIH (Marquis, Lewandowski et al. 2006). De plus, on a observé que, chez une souris transgénique exprimant le génome tronqué du VIH, la présence des lymphocytes T CD8 est nécessaire afin de limiter la prolifération de *C. albicans* à la muqueuse buccale (Marquis, Lewandowski et al. 2006).

Tel que mentionné plus haut, l'infection au VIH entraîne une déplétion progressive des lymphocytes T CD4. Alors que l'état de porteur asymptomatique de *Candida* n'est pas lié au décompte de ces lymphocytes dans le sang (Liu, Liu et al. 2006), l'apparition de la COP est quant à elle directement liée à l'immunodéficience créée par la perte des cellules T CD4 (Kolokotronis, Kioses et al. 1994). On croit que la déplétion de même que la perte de fonction de ces lymphocytes s'ajoutent à un défaut de la présentation antigénique normalement effectuée grâce aux cellules présentatrices d'antigènes (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004).

### 3.2.3 Cellules effectrices

#### **PMNs**

Les PMNs ne sont pas infectés par le VIH. Il a cependant été envisagé que leurs fonctions puissent être affectées due à une production de cytokines déficiente lors de la phase SIDA. On sait maintenant que, chez la souris transgénique exprimant le génome tronqué du VIH, les fonctions de phagocytose et de fongicidie des PMNs à

l'égard de *C. albicans* ne sont pas altérées. De plus, la déplétion expérimentale des neutrophiles chez ce même modèle a démontré que la présence de cette population cellulaire n'était pas requise afin de limiter la prolifération de *Candida* dans la cavité buccale (Marquis, Lewandowski et al. 2006). Par ailleurs, un faible nombre de PMNs a été observé dans les lésions de COP chez les patients infectés au VIH (Dongari-Bagtzoglou and Fidel 2005). Les perturbations au niveau des fonctions de ces cellules dans la défense contre l'infection à *C. albicans* dans le contexte du VIH ne sont donc toujours pas clairement établies.

### **Cellules dendritiques**

Chez les patients infectés au VIH, on observe une diminution significative du nombre de cellules dendritiques dès la phase asymptomatique de la maladie. (Macatonia, Lau et al. 1990). De plus, les perturbations au niveau des fonctions des DCs précèdent généralement l'apparition des signes cliniques de la maladie. Il a été démontré que les DCs exposées au VIH perdent la capacité de présenter adéquatement les antigènes autres que le virus lui-même (Knight, Patterson et al. 1991). Plus précisément, une déplétion des cellules de Langerhans est observée dans la muqueuse buccale, conjointement avec la présence de lésions fongiques (Chou, Epstein et al. 2000).

Les défauts de nombre et de fonction de ces cellules peuvent être attribués à différents facteurs tels que la lyse des DCs infectées par les lymphocytes T cytotoxiques ou la diminution d'expression des molécules de surface du CMH-I et CMH-II (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). Dans le modèle murin exprimant le génome tronqué du VIH, le nombre de DCs est aussi plus faible que celui observé normalement, et une accumulation de cellules immatures a été démontrée. L'habileté de ces cellules à présenter des antigènes est de plus diminuée *in vitro* (Poudrier, Weng et al. 2003). Ces résultats portent à croire que la reconnaissance ainsi que

l'apprêtement des antigènes de *C. albicans* par les cellules de Langerhans présentes dans la muqueuse buccale pourraient être altérées.

### **Macrophages**

Alors que les lymphocytes T CD4 et les DCs diminuent en nombre durant la progression de l'infection au VIH-1, il en est autrement pour les macrophages. En effet, le virus contrôle leurs voies transcriptionnelles afin d'inhiber l'apoptose de ces cellules, dès lors transformées en réservoirs à l'intérieur lesquels la réplication virale est favorisée (Vazquez, Greenwell-Wild et al. 2005). De plus, il a été démontré qu'aux stades avancés de la maladie, la co-infection des macrophages par un pathogène opportuniste vient induire une augmentation de la réplication virale (Orenstein, Fox et al. 1997).

Dans le contexte de l'infection au VIH, les macrophages des patients subissent de nombreuses perturbations fonctionnelles. Tout d'abord, les monocytes du sang périphérique (précurseurs de macrophages inflammatoires) de patients en phase SIDA démontrent une capacité réduite à migrer en réponse à l'inflammation in vivo (Wahl, Allen et al. 1989). De nombreux groupes ont de plus observé des défauts de phagocytose des macrophages envers différents pathogènes tels que *Toxoplasma gondii* (Biggs, Hewish et al. 1995), *Mycobacterium avium* (Kedzierska, Mak et al. 2000) ou *C. albicans* (Crowe, Vardaxis et al. 1994). La capacité des macrophages à tuer *Candida* intracellulaire est aussi atténuée chez les patients infectés au VIH (Crowe 1995) (Baldwin, Fleischmann et al. 1990). Finalement, le virus a la capacité d'induire la production ou la suppression de nombreuses cytokines inflammatoires ou régulatrices (Kedzierska and Crowe 2001). Il a été démontré que parmi ces cytokines, le TNF- $\alpha$  est sécrété en quantité moindre suite à la reconnaissance des pathogènes par les macrophages via le TLR4 chez les patients infectés au VIH (Tachado, Zhang et al. 2005).

La façon dont le virus agit sur les macrophages n'est pas complètement élucidée. Par contre, on sait maintenant que la protéine Nef joue un rôle primordial quant à la modulation des voies de signalisation chez le macrophage. En particulier, il semble que Nef active la voie du NF- $\kappa$ B, ce qui entraîne la production de facteurs solubles induisant l'activation de STAT-3 (Percario, Olivetta et al. 2003). Ceci serait responsable de la production accrue de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-1  $\beta$ , IL-6, et TNF- $\alpha$  par les macrophages infectés (Olivetta, Percario et al. 2003). Nef est de plus reconnue pour interagir avec des protéines de la famille des sérine/thréonine kinases, dont la Nef associated kinase (NAK), qui a été identifiée comme étant la p-21 activated kinase, PAK2 (Vincent, Priceputu et al. 2006). Cette association pourrait être impliquée au niveau du réarrangement du cytosquelette, de la cascade des MAP-kinases et de l'inhibition de l'apoptose (Rudel and Bokoch 1997). Finalement, il a été démontré que Nef était responsable de l'inhibition de production d'espèces réactives de l'oxygène par les macrophages (Olivetta, Pietraforte et al. 2005).

## **Chapitre 4 : Les modèles animaux permettant l'étude de la COP**

### 4.1 Les modèles de candidose

Les modèles animaux sont nécessaires à la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'infection oropharyngée ou systémique à *Candida*. Pour des raisons économiques tout autant que pratiques, la souris est souvent retenue comme modèle de choix. L'utilisation de cet animal permet effectivement des manipulations faciles, l'obtention aisée de réactifs immunologiques spécialement conçus pour cette espèce ainsi que la création d'animaux transgéniques (de Repentigny 2004). Les souris immunodéprimées ont largement été utilisées afin d'évaluer leur résistance à la candidose disséminée. La souris SCID par exemple, qui ne possède pas de lymphocytes fonctionnels, est susceptible à l'infection orogastrique, systémique et disséminée à *C. albicans* lorsqu'on induit l'apoptose de ses PMNs (Jensen, Warner et al. 1993).



## 4.2 Souris transgéniques exprimant le génome du VIH-1

Le premier modèle murin permettant l'étude de la COP dans le contexte du VIH a été la souris MAIDS (Murine Acquired Immuno-Deficiency Syndrome), développée par l'équipe de Noëlla Deslauriers à l'Université Laval. Les souris de lignée C57/B6, dix jours après une infection intra-orale à *C. albicans*, se voyaient injecter une mixture de rétrovirus murins provoquant l'apparition de symptômes associés au SIDA murin (Deslauriers, Cote et al. 1997). La maladie virale permettait d'observer des récurrences d'infection du champignon au niveau buccal chez certains animaux. Il s'agit d'un modèle intéressant puisqu'il reproduit partiellement certaines pathologies causées par le VIH, telles qu'une hypergammaglobulinémie, une lymphadénopathie ainsi qu'une splénomégalie. Au niveau du système immunitaire, de nombreux effets étaient de plus mimés, soient l'activation polyclonale des lymphocytes B, la perturbation de la prolifération des lymphocytes T, ainsi qu'une susceptibilité accrue aux infections et au développement de lymphomes. Toutefois, ce modèle demeurait imparfait puisque la perte progressive des lymphocytes T CD4 n'était pas observée, ce qui limitait la comparaison aux phases précoces de l'infection au VIH (Deslauriers, Cote et al. 1997).

Il existe aujourd'hui un modèle murin permettant d'étudier la COP dans des circonstances mimant plus fidèlement la maladie provoquée par le VIH-1. Ces animaux expriment une portion du génome du VIH-1 sous le contrôle de promoteurs humains ou murins, ce qui permet de limiter l'expression du transgène aux populations cellulaires souhaitées. Ces souris développent une maladie semblable au SIDA, présentant des symptômes tels que l'amaigrissement, l'atrophie et la fibrose des organes lymphoïdes, l'affection rénale, une déplétion des lymphocytes T CD4 ainsi qu'une mort prématurée (Hanna, Kay et al. 1998). La sévérité de la maladie est toujours corrélée au niveau d'expression du transgène. Il a été démontré que les souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et CD4C/HIV<sup>Nef</sup> infectées oralement à *C. albicans* développent un état de porteur chronique suite à une primo-infection fulgurante, pour finalement permettre une prolifération accrue du champignon peu

avant leur mort (de Repentigny, Aumont et al. 2002) (Marquis, Lewandowski et al. 2006).

Plusieurs variantes basées sur ce modèle ont été générées. De façon générale, le transgène inséré est constitué d'un *enhancer* murin CD4, d'un promoteur humain CD4C ainsi que du génome muté du VIH-1 (Hanna, Kay et al. 1998) (figure 6). Cet agencement permet l'expression du transgène dans les cellules leucocytaires exprimant la molécule de surface CD4, soit les thymocytes CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup>, les lymphocytes T CD4, les cellules dendritiques ainsi que les macrophages (Hanna, Rebai et al. 2001). Il a été démontré que seule la présence du gène *nef* intact à l'intérieur du transgène est suffisant afin d'induire l'apparition d'une maladie similaire au SIDA (Hanna, Kay et al. 1998). Les différentes lignées génétiques sont toutes conçues au laboratoire du Dr Paul Jolicoeur, de l'Institut de recherches cliniques de Montréal.

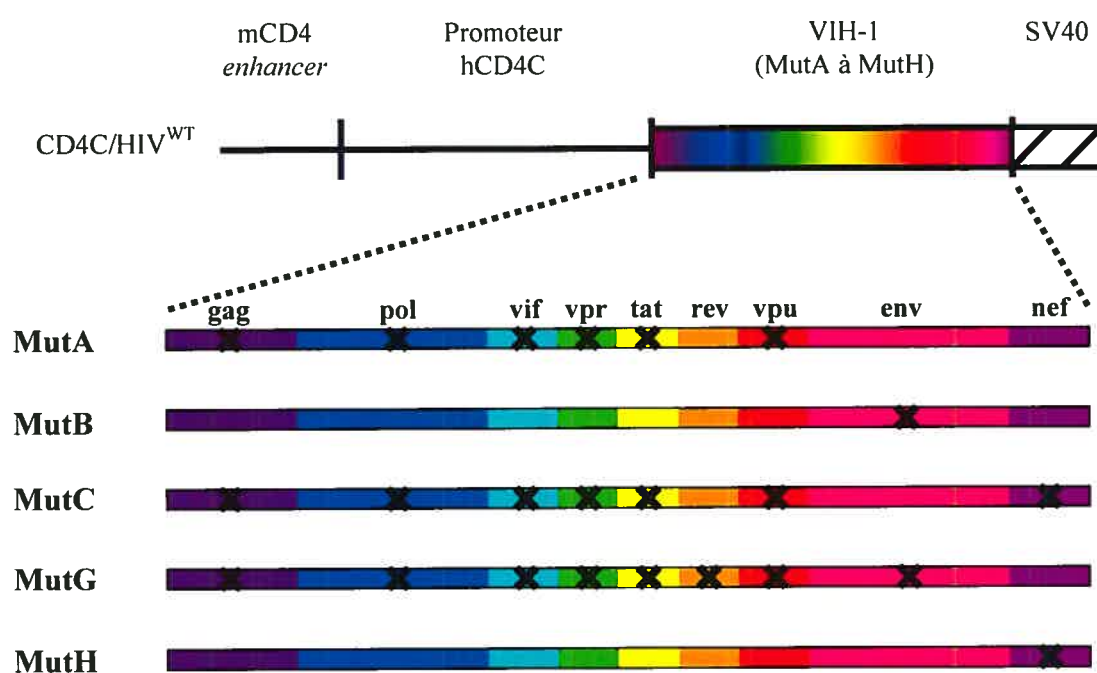


Figure 6: Structure des transgènes CD4C/HIV<sup>Mut</sup>. Le *enhancer* murin CD4, le promoteur humain CD4, chacun des génomes mutés du VIH-1 et la séquence de polyadénylation du virus simien 40 (SV40) ont été reliés. Inspiré de Hanna, Kay et al. 1998

#### 4.2.1 Souris CD4C/HIV<sup>MutA</sup>

Les souris CD4C/HIV<sup>MutA</sup> expriment les gènes *rev*, *env* et *nef* du VIH-1. Leur espérance de vie est variable, et les symptômes de la maladie apparaissent entre 30 jours et 16 mois après la naissance, selon le niveau d'expression du transgène (Hanna, Kay et al. 1998). Tel que mentionné plus haut, les souris CD4C/HIV<sup>MutA</sup> demeurent porteuses de *C. albicans* de façon chronique suite à une infection intra-orale. Une dissémination aux organes profonds peut être observée chez certains animaux, lors de la phase terminale de la maladie (de Repentigny, Aumont et al. 2002).

#### 4.2.2 Souris CD4C/HIV<sup>Nef</sup>

Les souris CD4C/HIV<sup>Nef</sup>, anciennement appelées CD4C/HIV<sup>MutG</sup>, expriment un transgène ne possédant que le gène *nef* intact. Comme ces animaux développent eux aussi une maladie similaire au SIDA, il appert que *Nef* soit un déterminant majeur de la maladie (Hanna, Kay et al. 1998). De plus, cette souris transgénique permet aussi d'observer un état de porteur chronique de *C. albicans* chez les animaux infectés intra-oralement (Marquis, Lewandowski et al. 2006). C'est généralement sur la base de ce modèle que sont créées les souris Tg *knock-out* pour un ou des gènes donnés. Parmi celles publiées à ce jour, notons la souris CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>-/-</sup>, animal qui permet d'identifier le rôle joué par les lymphocytes T CD8 dans la défense contre la COP (Marquis, Lewandowski et al. 2006). D'autres lignées présentant des variantes du transgène et/ou différents promoteurs sont actuellement étudiées, tant pour la fidélité avec laquelle elles miment les manifestations cliniques du VIH que pour l'opportunité qu'elles offrent de comprendre les mécanismes permettant l'établissement d'une infection à *Candida* chez l'hôte immunodéprimé.

## Raisonnement et Hypothèses

Sachant que :

- i. La COP est une infection opportuniste répandue chez les patients infectés au VIH-1 et/ou ayant atteint le stade SIDA;
- ii. L'apparition des manifestations cliniques d'infection oropharyngée à *Candida* est directement corrélée aux pertes de fonctions du système immunitaire ainsi qu'à la diminution du nombre des lymphocytes T CD4;
- iii. Certains mécanismes compensatoires agissent afin de limiter la COP aux muqueuses ;
- iv. Une souris transgénique mimant les désordres immunologiques liés à l'infection au VIH-1 ainsi que les pathologies associées au SIDA est disponible,

Nous proposons l'hypothèse que, chez ce modèle murin:

- i. Les PMNs et/ou les macrophages restreignent le nombre de *C. albicans* proliférant aux muqueuses buccale et œsophagienne;
- ii. Les PMNs et/ou les macrophages préviennent la dissémination de *C. albicans* aux organes profonds.

## Matériel et Méthodes

### Modèle animal de COP

Tableau I : Caractérisation des différentes lignées de souris transgéniques provenant du laboratoire du Dr Paul Jolicoeur

Lignée	Promoteur	Gènes fonctionnels exprimés	Cellules exprimant le transgène
CD4C/HIV <sup>MutA</sup>	CD4C humain	nef, rev et env	Lymphocytes T CD4, macrophages et DCs
CD4C/HIV <sup>Nef</sup>	CD4C humain	nef	Lymphocytes T CD4, macrophages et DCs
CD4C/HIV <sup>Nef</sup> CD8 <sup>-/-</sup>	CD4C humain	nef	Lymphocytes T CD4, macrophages et DCs
CD4C/HIV <sup>Nef</sup> CD8 <sup>+/-</sup>	CD4C humain	nef	Lymphocytes T CD4, macrophages et DCs
mCD4/HIV <sup>Nef</sup>	CD4 murin	nef	Lymphocytes T CD4
CD4F/HIV <sup>Nef</sup>	CD4F humain	nef	Lymphocytes T CD4

### Souris Tg

Les souris Tg ainsi que les témoins non-Tg sont certifiés sans pathogènes spécifiques et hébergés conjointement en micro-isolation, dans un environnement stérile. Une colonie de lignée CD4C/HIV<sup>MutA</sup> est entretenue à l'animalerie de l'Université de Montréal. Les mâles positifs quant à l'expression du transgène peuvent être choisis comme reproducteurs, et sont alors jumelés à deux jeunes

femelles C3H non-Tg (Charles Rivers). Le typage de chaque animal de la colonie est assuré par réaction en chaîne par polymérase (PCR), à l'aide d'oligonucléotides spécifiques au transgène. Les souris Tg sous protocole sont hébergées à l'écart des animaux non-Tg témoins afin d'éviter des contaminations fongiques inter-groupes dues à la coprophagie. Lorsque de nouvelles lignées de souris Tg sont disponibles, une dizaine d'individus nous parvient, que nous hébergeons dans le laboratoire sous environnement stérile. La génération de nouvelles souris portant des transgènes différents est assurée par le laboratoire du Dr Paul Jolicoeur. Les souris homozygotes pour l'absence d'expression du marqueur CD8 ont été obtenues de Tak Mak, puis ont été croisées avec des animaux Tg C3H CD4C/HIV<sup>Nef</sup> pour donner naissance à une lignée CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>-/-</sup>. Certains résultats concernant les lignées CD4C/HIV<sup>Nef</sup>, mCD4/HIV<sup>Nef</sup> et CD4F/HIV<sup>Nef</sup> sont aussi présentés dans ce mémoire.

### Infection à *C. albicans*

La souche LAM-1 de *C. albicans* est conservée à -80°C. Quelques jours avant l'infection des groupes de souris, une bouclée est prélevée afin d'ensemencer une gélose Sabouraud-Dextrose (BBL), qui est incubée à 30°C pour 24 heures puis conservée à 4°C jusqu'à utilisation. Le jour précédent l'infection des souris, une bouclée de *C. albicans* LAM-1 est prélevée de la gélose puis mise en culture dans 3 mL de bouillon Sabouraud-Dextrose (BBL) sous agitation à 30°C pour 24 heures. Cette incubation permet d'obtenir des cellules en phase de croissance exponentielle. Deux lavages dans 5 mL de PBS stérile (10mM [pH 7.4]) sont effectués avec centrifugations (Jouan, CR3i) à 2000 RPM pendant 5 minutes chaque fois. Les cellules sont finalement resuspendues dans 2 mL de PBS et une série de dilutions est effectuée afin de faciliter le décompte cellulaire à l'hémacytomètre. Une quantité de  $1 \times 10^8$  cellules viables par souris est nécessaire à l'infection. Le volume correspondant à  $1 \times 10^8$  est alors calculé puis distribué dans un nombre suffisant de tubes Eppendorf selon les animaux requis. Une nouvelle centrifugation est effectuée dans la mini-

centrifugeuse afin de culotter *C. albicans*. Le surnageant est retiré à l'aide d'une pipette Pasteur amincie, puis les cellules sont prêtes pour utilisation.

L'infection des souris se déroule sous anesthésie générale afin de faciliter la répartition du champignon sur l'ensemble de la muqueuse buccale et prévenir sa déglutition par l'animal. Pour ce faire, les animaux reçoivent 100  $\mu$ L par la voie intrapéritonéale d'une préparation diluée de kétamine/xylazine. Il faut compter de 5 à 10 minutes avant que les souris soient suffisamment somnolentes pour être manipulées sans réagir. L'application des conidies de *C. albicans* est faite grâce à un écouvillon stérile à embout d'alginate de calcium (Calgiswabs, Puritan). Les cellules contenues dans un Eppendorf sont donc prélevées puis distribuées également à la surface de la muqueuse buccale. Toutes les manipulations sont effectuées sous hotte biologique afin de prévenir tout risque d'infection chez les souris transgéniques. Celles-ci sont remises dans leur cage puis elles sont observées en cours de journée afin de s'assurer que le réveil se déroule bien.

### Décompte de CFUs buccaux

Suite à l'infection, des prélèvements sont effectués afin d'évaluer quantitativement le nombre de cellules de *C. albicans* colonisant les muqueuses buccales. Pour ce faire l'animal est maintenu fermement, puis on frotte l'intérieur des joues, la langue et le palais avec un écouvillon qu'on dispose dans un tube conique de 15 mL contenant 2 mL de solution de Ringer. Lorsque toutes les souris ont été écouvillonnées, chaque tube est agité au vortex puis un volume prédéterminé (50, 100 ou 200  $\mu$ L) est prélevé et distribué à la surface d'une gélose Sabouraud–Dextrose pré-identifiée à l'aide de billes stériles. Les géloses sont incubées 24 heures à 30°C puis le nombre d'unités formatrices de colonies (CFU) peut être quantifié. La charge buccale est exprimée en CFU par 2 mL de solution de Ringer. De façon générale, les souris subissent des prélèvements tous les jours de la première semaine suivant l'infection. Par la suite, deux prélèvements par semaine sont effectués. Il est

important de noter que les animaux sont souvent examinés afin de s'assurer que leur état ne se dégrade pas au point où ils atteindraient certains points critiques nécessitant leur euthanasie. Dans le cas des souris étudiées au laboratoire, ces points limites sont généralement une perte de poids importante, de la difficulté à se déplacer, un pelage hérissé, le dos courbé ainsi qu'une déshydratation.

### Décompte de CFUs dans les organes

L'euthanasie d'un animal peut survenir à une date prédéterminée ou suite à l'atteinte de points limites. La souris est pesée puis un prélèvement buccal pour quantification des CFUs est effectué. Elle est anesthésiée par injection intrapéritonéale de 400  $\mu$ L d'un mélange de kétamine/xylazine dilué. La souris est ensuite fixée sur la table à l'aide de ruban adhésif, puis un volume sanguin d'environ 1 mL est prélevé par ponction cardiaque avec une seringue de 1 mL 25G5/8 préalablement héparinée. Suite au prélèvement de sang, la souris est sacrifiée par dislocation cervicale.

L'animal mort est solidement fixé à l'aide d'aiguilles puis disséqué sous hotte biologique. Il est important de porter une attention particulière au risque de contamination des organes profonds par le contenu gastro-intestinal. Les organes suivants sont prélevés : foie, reins, poumons, cerveau, estomac, petit et gros intestin. Chaque organe est transféré sur un papier d'aluminium stérile qui est ensuite refermé afin d'isoler l'organe lors de sa pesée. On le dépose alors dans un mortier stérile en vue d'être broyé à l'aide d'un pilon. Afin de faciliter la tâche, une petite quantité de poudre d'alundum et de PBS sont ajoutés. L'organe broyé est ensuite déposé dans un tube de 15 mL stérile et le volume de PBS final est ajusté à 5 mL pour le foie, les reins, les poumons et le cerveau et à 8 mL pour l'estomac ainsi que les petit et gros intestins. Par la suite, 200  $\mu$ L de l'homogénat obtenu pour chacun des organes est étalé sur gélose Sabouraud-Dextrose préalablement identifiée, en duplicata. Dans le cas de l'estomac ainsi que des intestins, des dilutions  $10^{-1}$  des homogénats sont aussi



étalées afin de faciliter le décompte des CFUs. Les géloses sont incubées à 30°C pour une durée de 24 heures afin de permettre la croissance des colonies. La dissémination aux organes profonds est ensuite évaluée en comptant le nombre de CFUs retrouvés dans chacun des organes, et en rapportant cette quantité par gramme de tissu.

Afin de s'assurer de l'absence de vers intestinaux chez ces animaux, une section des petits et gros intestins des souris disséquées est envoyée au service d'animalerie de l'Université afin de procéder aux recherches appropriées. Par ailleurs, une souris témoin non infectée est toujours disséquée en fin d'expérimentation et ses organes étalés parallèlement aux animaux étudiés afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de contamination croisée. Dans ce but, les instruments utilisés lors des dissections sont désinfectés à l'aide de Virkon 1% (Dispar) et d'éthanol 100% puis flambés, ce entre chaque organe. De nouveaux instruments sont de plus utilisés pour chaque animal.

### Transfert adoptif de lymphocytes T CD8

Quatre souris Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>-/-</sup> ont reçu par injection intra-veineuse  $2,5 \times 10^6$  lymphocytes T CD8 provenant d'animaux C3H non-Tg. Les cellules sont resuspendues dans 120µL de saline stérile. Quatre souris contrôles sont injectées par voie intra-veineuse avec un volume équivalent de saline. Les lymphocytes T CD8 sont isolés du sang total des donneurs par sélection négative sur billes magnétiques. Suite au transfert, les souris subissent des prélèvements buccaux quotidiens puis bi-hebdomadaires.

## Isolement et activité fonctionnelle des PMNs

### Isolement des PMNs

Les souris sont anesthésiées par injection intra-péritonéale de 400 $\mu$ L de mélange kétamine/xylazine. Lorsqu'elles sont profondément endormies, elles sont fixées à la table à l'aide de ruban adhésif. Une ponction cardiaque est effectuée avec une seringue 1mL 25G3/4 préalablement héparinée. Tous les prélèvements provenant de souris du même groupe (ex : souris Tg non-infectées) sont réunis dans un tube de 50 mL, sous hotte biologique. Le sang recueilli est dilué 1 :2 avec du PBS stérile. À l'aide d'une seringue 3 mL fixée à une aiguille 16G, 3 mL de gradient Histopaque 1119 sont déposés dans des tubes coniques de 15 mL (attention de ne pas faire de bulles). 3 mL de Histopaque 1077 sont alors déposés délicatement sur le gradient avec une seringue semblable à la précédente. Par la suite, 6 mL de sang dilué est distribué délicatement à la surface du 2<sup>e</sup> gradient avec une pipette Pasteur. Les tubes sont centrifugés pendant 50 minutes à une vitesse de 1400 RPM. Suite à la séparation cellulaire, il faut retirer à l'aide de trois pipettes Pasteur effilées différentes tout le PBS se retrouvant en surface, ainsi que l'anneau de cellules mononucléées et le gradient 1077 situés juste en dessous. En utilisant une nouvelle pipette effilée, on transfère l'anneau de PMNs restant ainsi qu'une partie du gradient 1119 (il ne faut pas risquer d'aspirer les érythrocytes situés en dessous du gradient) dans un nouveau tube. 5 mL de PBS sont ajoutés à chacun des nouveaux tubes contenant les PMNs puis on procède à une nouvelle centrifugation à 1200 RPM pour 10 minutes. Les cellules doivent à nouveau être lavées dans 5 mL de PBS. Suite à ce deuxième lavage, les PMNs contenus dans les différents tubes peuvent être réunis. Ceux-ci sont resuspendus dans 5 mL d'une solution de lyse des érythrocytes (PharmLyse, BD Biosciences). Une attente de 5 minutes doit être respectée avant de centrifuger à nouveau (1200RPM, 10 minutes). Un dernier lavage au PBS est ensuite effectué, puis les cellules sont finalement resuspendues dans 1 mL de RPMI supplémenté. Les

PMNs sont comptés à l'hémacytomètre et leur viabilité est mesurée à l'aide d'une coloration au bleu de Trypan.

### Quantification de la phagocytose de *C. albicans* par les PMNs

Le protocole de quantification de la phagocytose par les PMNs permet de mesurer le nombre de PMNs ayant phagocyté une/des cellule(s) de *C. albicans*, tel que décrit par Marquis M. *et al*, en 2006 (Marquis, Lewandowski et al. 2006). La veille de l'expérimentation, quatre tubes de 15 mL contenant chacun 3 mL de bouillon Sabouraud-Dextrose et une bouclée de *C. albicans* LAM-1 conservé à 4°C sont mis en incubation à 30°C sous agitation. Le jour de l'expérience, suite à l'isolement des PMNs (ou pendant les centrifugations), les conidies incubées durant la nuit dans différents tubes sont réunies. Deux lavages dans 5 mL de PBS stérile avec centrifugations de 5 minutes à une vitesse de 2000 RPM sont ensuite effectués. Une série de dilutions est faite afin de faciliter le décompte des cellules à l'hémacytomètre. Deux Eppendorfs contenant chacun  $5 \times 10^7$  cellules dans 0,5 mL de PBS sont mis à chauffer à 95°C pendant 40 minutes ou jusqu'à ce que tout le *Candida* soit perméable au bleu de Trypan.

Pendant ce temps, 10 mL d'une solution de FITC (fluorescein isothiocyanate) sont préparés dans un tube de 50 mL, à une concentration de 100 µg/mL dans du PBS. Les cellules perméabilisées sont marquées avec une concentration de FITC de 1 µg/mL. On ajoute donc 50 µL de la solution de FITC aux 500 µL de PBS contenant le *C. albicans*, puis on complète le volume à 5 mL avec du tampon carbonate/bicarbonate (0,2M, pH 9,6). Le marquage s'effectue en agitation à 4°C, à la noirceur, pour une durée de 60 minutes. Par la suite, les cellules sont lavées trois fois dans 2 mL de PBS stérile avec centrifugations de 5 minutes à 2000 RPM. Elles sont resuspendues dans 500 µL de PBS puis recomptées. Le volume nécessaire à l'obtention de  $1,25 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$  et  $1,25 \times 10^6$  cellules est calculé.

La phagocytose se déroule en plaques à culture cellulaire de 96 puits. Une quantité de  $2,5 \times 10^5$  PMNs est ajoutée à chaque puit, dans un volume de 100  $\mu\text{L}$ . Très rapidement, le *C. albicans* est ajouté à chacun des puits selon le ratio PMNs : *C. albicans* voulu (2 :1, 1 :2 ou 1 :5). La phagocytose se déroule à 37°C, pour une durée de 5, 15 ou 30 minutes. Par la suite, le contenu des puits est transféré dans des tubes à cytométrie identifiés, auxquels 100  $\mu\text{L}$  de milieu RPMI supplémenté est ajouté. Les cellules sont maintenues constamment sur la glace jusqu'au moment où leur contenu est visualisé au cytomètre en flux. Quelques secondes avant de passer à l'appareil, 2  $\mu\text{L}$  de bromure d'éthidium à 10mg/mL est ajouté à chaque tube afin que l'on puisse distinguer le *C. albicans* phagocyté de celui adhérent aux PMNs.

Lors de cette expérience, le témoin négatif est constitué de puits contenant les PMNs et le *C. albicans* dans un ratio de 1 :5, auxquels on a ajouté un volume de 2  $\mu\text{L}$  de Cytochalasine B (Sigma, 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) afin d'inhiber la phagocytose des PMNs. De plus, la phagocytose de ce témoin négatif se déroule sur glace au lieu de 37°C.

### Quantification de l'activité fongicide des PMNs à l'égard de *C. albicans*

Le protocole d'évaluation de l'activité fongicide des PMNs est similaire à celui d'évaluation de la phagocytose. Cette fois, le *Candida* utilisé n'est pas perméabilisé, et c'est donc le % de *C. albicans* tué par les PMNs qui est étudié. Ainsi, suite aux lavages de *C. albicans*, celui-ci est directement marqué au FITC, cette fois à une concentration de 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , donc 250  $\mu\text{L}$  de la solution préparée est nécessaire. Les durées de contact entre les PMNs et *C. albicans* diffèrent, étant cette fois de 30, 60 ou 90 minutes. Un seul ratio PMNs : *Candida* est évalué, soit 1 :1. Suite à l'incubation des PMNs et de *Candida*, chacun des puits est transféré dans un tube à cytométrie auquel on ajoute 250  $\mu\text{L}$  d'une solution à 2,5% de désoxycholate de sodium afin de lyser les cellules de mammifères. On attend 5 minutes puis on centrifuge les tubes pendant 5 minutes à 2000 RPM. Le surnageant est enlevé puis les cellules sont remises en suspension dans 250  $\mu\text{L}$  de PBS avant d'être déposées sur glace. Comme

pour la phagocytose, chaque tube reçoit 2 $\mu$ L de bromure d'éthidium à 10mg/mL avant d'être analysé au cytomètre en flux. Les témoins consistent aussi en des puits dans lesquels on a ajouté 2 $\mu$ L de cytochalasine B (Sigma, 5 $\mu$ g/mL) et que l'on a incubé à 4°C.

### Isolement et activité fonctionnelle des PECs/Macrophages

#### Récolte des cellules d'exsudat péritonéal (PECs):

Afin de favoriser la migration des macrophages vers la cavité péritonéale des animaux, 1 mL de thioglycolate de sodium (Sigma; 0,36g/L) est injecté par la voie intra-péritonéale. Pour la quantification de la production de NO et de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, un minimum de 5 souris par groupe est nécessaire. Trois jours plus tard, les PECs sont récupérés. Pour ce faire, les souris sont anesthésiées avec 500 $\mu$ L du mélange kétamine/xylazine (ket : 1.5mL, xyl : 0.1mL, PBS : 8.4mL) injecté par la voie sous-cutanée (peau du cou). Lorsque l'animal est endormi, il est fixé sur le comptoir puis la peau recouvrant l'abdomen est détachée à l'aide d'une lame de scalpel. 8-9 mL de PBS stérile froid (10mM, pH 7,4) est ensuite injecté dans la cavité péritonéale à l'aide d'une seringue de 10mL munie d'une aiguille 22 ou 23G. Afin de favoriser le recrutement cellulaire, il faut masser l'abdomen en cours d'injection. À l'aide de la même seringue, le liquide injecté est retiré puis déposé dans un tube conique identifié en prenant soin d'ôter préalablement l'aiguille afin d'éviter d'endommager les cellules. On pose ensuite une nouvelle aiguille, puis on réinjecte à l'animal un volume de PBS égal à celui prélevé précédemment tout en massant l'abdomen. Il faut par la suite récupérer à nouveau le plus de liquide possible et le déposer dans le même tube conique. La procédure est la même pour chaque souris, et il importe de changer la seringue utilisée entre les groupes d'animaux (Tg vs non-Tg).

Suite au prélèvement des cellules, les PECs sont centrifugés pendant 9 minutes à 1000 RPM. Le surnageant est ensuite retiré, puis les culots sont mis en commun selon le groupe en resuspendant les cellules dans 0.5 mL /souris de solution de lyse des érythrocytes. Il faut centrifuger immédiatement pendant 9min à 1000 RPM afin d'éviter d'endommager les macrophages. Le surnageant est par la suite aspiré, et un lavage dans 5 mL de PBS température pièce est effectué (centrifugation de 9 min à 1000 RPM). Le surnageant est à nouveau prélevé, et les culots sont finalement resuspendus dans 0,5 mL de milieu par souris (la composition du milieu varie selon l'usage fait des cellules). Il est alors possible de faire un décompte à l'hémacytomètre. Le volume final de milieu est par la suite ajusté afin d'obtenir le nombre désiré de cellules ( $4 \times 10^6$ ) par mL. 100 $\mu$ L de milieu contenant les PECs est déposé dans chaque puit d'une microplaque à culture à fond clair de 96 puits (Corning, 3595). Un lavage au HBSS sans rouge de phénol est effectué après 2 heures d'incubation à 37°C, avec 5% de CO<sub>2</sub>, afin d'éliminer les cellules non adhérentes.

### Quantification de la phagocytose de *C. albicans* par les macrophages (M $\Phi$ ) péritonéaux

Le protocole permet de quantifier le pourcentage de M $\Phi$  ayant phagocyté une/des cellule(s) de *C. albicans*. La préparation du *Candida* se déroule de même façon que lors des expériences de phagocytose par les PMNs. Suite au marquage, les levures sont recomptées et le volume nécessaire à l'obtention de  $2,5 \times 10^5$ ,  $1,25 \times 10^6$  et  $2,5 \times 10^6$  cellules est calculé.

La phagocytose se déroule selon le protocole utilisé pour les PMNs. Les suspensions cellulaires sont constituées de ratios M $\Phi$  : *C. albicans* de 1 :1, 1 :5 et 1 :10. Les incubations se déroulent durant 15, 30, 45 ou 60 minutes. Encore une fois, avant de passer au cytomètre, 2  $\mu$ L de bromure d'éthidium à 10mg/mL sont ajoutés à chaque microtube afin que l'on puisse distinguer le *C. albicans* phagocyté de celui adhérent aux M $\Phi$ .

Lors de cette expérience, le témoin négatif est constitué de microtubes contenant les MΦ et le *C. albicans* dans un ratio de 1 :10, auxquels on a ajouté un volume de 2μL de Cytochalasine B (Sigma, 5μg/mL) afin d'inhiber la phagocytose des MΦ. De plus, la phagocytose de ce témoin négatif se déroule sur glace au lieu de 37°C. Lors de l'analyse des résultats, on circonscrit au cytomètre la région de cellules correspondante aux MΦ, afin de mesurer spécifiquement la phagocytose par cette population cellulaire.

### Quantification de l'activité fongicide des PECs à l'égard de *C. albicans*

Le protocole d'évaluation de l'activité fongicide des MΦ identique à celui utilisé pour les PMNs. Les temps d'incubation entre les MΦ et *C. albicans* demeurent les mêmes, soit 30, 60 ou 90 minutes. Un seul ratio MΦ : *Candida* est évalué, soit 1 :1. Cette fois, chaque tube reçoit 20μL de bromure d'éthidium à 1μg/mL avant d'être analysé au cytomètre en flux. Les témoins consistent aussi en des puits dans lesquels on a ajouté 2μL de cytochalasine B et que l'on a incubé à 4°C.

### Quantification de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les macrophages péritonéaux

Les macrophages utilisés lors de la quantification de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> doivent être incubés dans un milieu RPMI (Gibco) supplémenté modifié (voir Annexe 1). Suite au décompte des PECs à l'hémacytomètre, un volume de milieu est ajusté pour obtenir 4x10<sup>6</sup> cellules par mL. 100μL de milieu contenant les PECs sont déposés dans chaque puit d'une microplaque à culture à fond clair de 96 puits (Corning, 3595). Un lavage au HBSS sans rouge de phénol (Gibco) est effectué après 2 heures d'incubation à 37°C, avec 5% de CO<sub>2</sub>, afin d'éliminer les cellules non adhérentes. Suite au lavage, les macrophages sont prêts afin de procéder au test. Ceux-ci sont alors incubés à nouveau pendant 2 heures dans 100 μL de tampon PRS (phenol red solution) en présence de *C. albicans*, d'activateur ou d'inhibiteur. Suite à

l'incubation, 10  $\mu\text{L}$  d'hydroxyde de sodium 1N sont ajoutés afin de stopper la réaction. Le témoin négatif consiste en des puits contenant les macrophages, le tampon PRS ainsi que 10  $\mu\text{L}$  d'hydroxyde de sodium 1N que l'on ajoute au temps 0 afin d'entraîner la mort cellulaire et donc empêcher toute production d' $\text{H}_2\text{O}_2$ . Les puits représentant le contrôle positif contiennent quant à eux 500nM de PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). Des concentrations de  $4 \times 10^5$  ou  $8 \times 10^5$  cellules viables de *C. albicans* LAM-1 sont aussi ajoutées à certains puits afin d'évaluer l'impact de leur présence sur la production de  $\text{H}_2\text{O}_2$ . La détection de  $\text{H}_2\text{O}_2$  peut alors être mesurée à l'aide d'un lecteur de microplaques à une longueur d'onde de 630nm (selon la méthode décrite par Pick et Mizel, 1982). La quantification est effectuée en se référant à une courbe standard contenant des concentrations déterminées de peroxyde d'hydrogène (de 0 à 50  $\mu\text{M}$ ).

### Quantification de la production de NO par les M $\Phi$ péritonéaux

Les macrophages utilisés lors la quantification de la production de NO sont préalablement incubés dans un milieu RPMI supplémenté (voir Annexe 1). Suite au décompte des PECs à l'hémacytomètre, le volume de milieu est ajusté pour obtenir  $4 \times 10^6$  cellules par mL. 100 $\mu\text{L}$  de milieu contenant les PECs est déposé dans chaque puit d'une microplaque à culture à fond clair de 96 puits (Corning, 3595). Un lavage au HBSS est effectué après 2 heures d'incubation à 37°C, avec 5% de  $\text{CO}_2$ , afin d'éliminer les cellules non fixées à la plaque. Suite au lavage, les macrophages adhérents sont remis en culture dans 100  $\mu\text{L}$  de milieu RPMI supplémenté contenant du *C. albicans* inactivé à la chaleur, un activateur ou un inhibiteur de NO. L'incubation se déroule à 37°C, avec 5% de  $\text{CO}_2$ , pour une période de 48 heures. 50  $\mu\text{L}$  de surnageant est ensuite prélevé délicatement du haut de chaque puit puis transféré dans une nouvelle plaque. 50  $\mu\text{L}$  de Griess Reagent (Sigma) est alors ajouté à chaque puit et la plaque est incubée à la noirceur, à température pièce, pour 15 minutes. La détection de NO s'effectue en lisant la plaque à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 570nm (selon la méthode décrite par Green et al. 1982). Une



courbe standard de nitrite de sodium (de 0 à 100  $\mu\text{M}$ ) est produite afin de quantifier la production de NO dans chacun des puits. Le témoin négatif est constitué de puits contenant des cellules ainsi que 400  $\mu\text{M}$  de L-NMMA ( $\text{N}^{\text{G}}$ -Methyl-L-arginine acetate salt, Sigma), qui agit comme inhibiteur de production de NO via la voie de l'arginine. Les puits servant de témoin positif contiennent 500 U d'IFN- $\gamma$ . Le *C. albicans* LAM-1 inactivé à la chaleur a été ajouté à raison de  $2.5 \times 10^5$  cellules par puits. De nombreux contrôles sans macrophages ont de plus été produits afin de mesurer le bruit de fond causé par la présence de *C. albicans*, du L-NMMA et de l'IFN- $\gamma$ .

### Déplétion des M $\Phi$

Afin d'évaluer l'effet d'une déplétion des M $\Phi$  sur les charges buccales de souris Tg infectées à *C. albicans*, plusieurs groupes de souris ont été traitées à la carraghénane. Les animaux ont été injectés avec 0,5mg, 0,75mg ou 1mg de  $\lambda$ -carraghénane (Sigma) dilué dans 0,2 mL de PBS stérile, par voie intra-péritonéale, après infection buccale à *C. albicans* ou non.

La muqueuse buccale des joues ainsi que du palais mou est délicatement disséquée afin d'y quantifier la déplétion des M $\Phi$ . Le tissu est rincé dans un tampon nettoyant (voir Annexe I) pendant 5 minutes, puis dans de la solution de Hanks (HBSS, Gibco). Les sections de muqueuse buccale sont découpées minutieusement et incubées pendant 60 minutes à 37°C dans du milieu RPMI (Gibco) supplémenté contenant 0,25% de collagénase type IV (Sigma). Après l'incubation, les cellules sont déposées sur un filtre de nylon de 70 $\mu\text{m}$  que l'on rince avec du milieu RPMI supplémenté afin d'éliminer les fragments de tissus non digérés. Les cellules sont recueillies et centrifugées (1000 RPM, 9 minutes) puis resuspendues dans du milieu RPMI supplémenté à raison de  $1 \times 10^6$  cellules/mL. La rate des animaux injectés à la carraghénane est aussi prélevée, écrasée et filtrée. Suite à une lyse des érythrocytes (PharmLyse, BD Biosciences), les cellules sont lavées dans du PBS stérile (1000

RPM, 9 minutes) puis resuspendues dans du milieu RPMI supplémenté, à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/mL.

Les cellules récupérées de la muqueuse buccale et de la rate des souris sacrifiées 48 heures après injection de carraghénane sont par la suite mises en incubation pour 30 minutes à 4°C avec les anticorps suivants : anti-CD11c murin (FITC, BD Biosciences), anti-CD45 murin (PE, BD Biosciences), anti-CD11b murin (PerCP-Cy5.5, BD Biosciences) et anti-F4/80 murin (APC, Caltag). Les cellules sont ensuite lavées dans du PBS stérile puis l'analyse des marqueurs de surface est effectuée grâce à un cytomètre de flux (FACSCalibur, BD Biosciences) pourvu du logiciel d'analyse CellQuest. Les résultats du tableau VI représentent la proportion de cellules exprimant les marqueurs de surface CD45, CD11b et F4/80 mais pas CD11c.

## Résultats

### Infection de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup>

Lors de cette expérience, un groupe de jeunes souris (entre 42 et 60 jours) CD4C/HIV<sup>MutA</sup> a été infecté au niveau de la muqueuse buccale avec *C. albicans* LAM-1, parallèlement à un groupe de souris de lignée C3H non-Tg. Les charges buccales moyennes de levures prélevées de façon quotidienne (jours 1 à 7 post-infection) ou bi-hebdomadaire (jours 9 à 56 post-infection) pour chaque groupe sont représentées à la figure 7. Une phase de primo-infection caractérisée par un pic de CFU atteignant jusqu'à  $1,5 \times 10^4$  champignons par 2 mL de solution de Ringer (données non montrées) est observée chez le groupe expérimental ainsi que le groupe témoin. Dès le jour 7, on note un écart entre les deux groupes puisque les animaux non-Tg ont éliminé presque complètement *C. albicans* alors que les souris Tg présentent un début d'infection chronique. Ainsi, les souris Tg sont demeurées porteuses de *C. albicans* jusqu'à la fin de l'expérience. Le décès d'un animal Tg au jour 51 post-infection a été précédé d'une remontée accrue de sa charge buccale de champignons.

### Infection de souris Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup>, Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>-/-</sup> et Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>+/-</sup>

Lors de cette expérience, trois groupes de souris Tg ont été infectés oralement de façon simultanée avec *C. albicans* LAM-1. Ces trois groupes présentant des transgènes différents ont été fournis par le laboratoire du Dr Paul Jolicoeur. Les charges buccales moyennes observées pour chaque groupe expérimental entre les jours 1 à 217 post-infection sont représentées à la figure 8.

Les trois groupes présentent une phase de primo-infection avec pic de CFU se déroulant entre les jours 1 à 14 suivant l'inoculation. Chez les souris Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup>, dont les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T

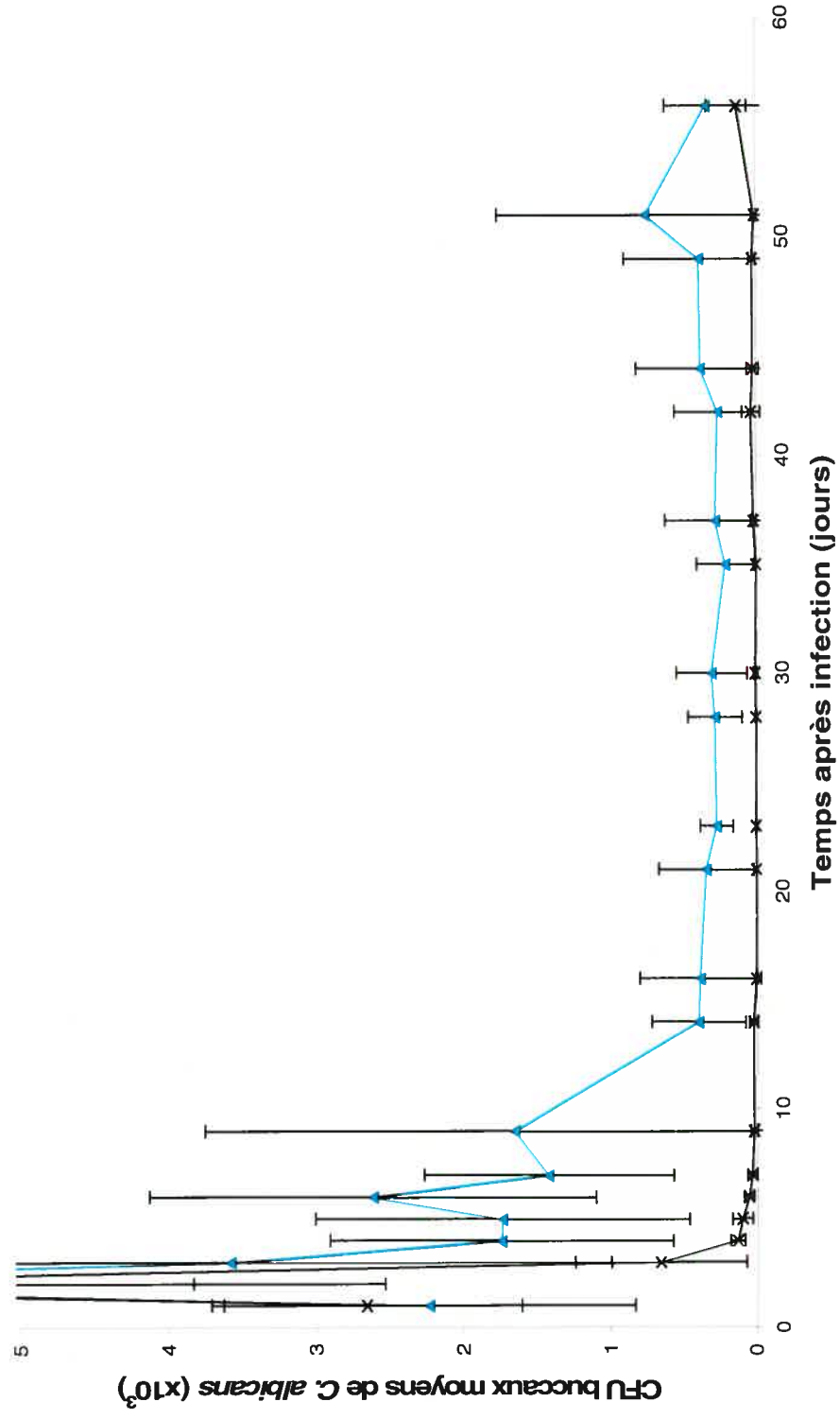


Figure 7: Charge buccale moyenne (CFU/ 2mL de solution de Ringer)  $\pm$  écart-type de *C. albicans* retrouvée chez des souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> (en turquoise) et non-Tg (en noir) entre les jours 1 et 56 post-infection.

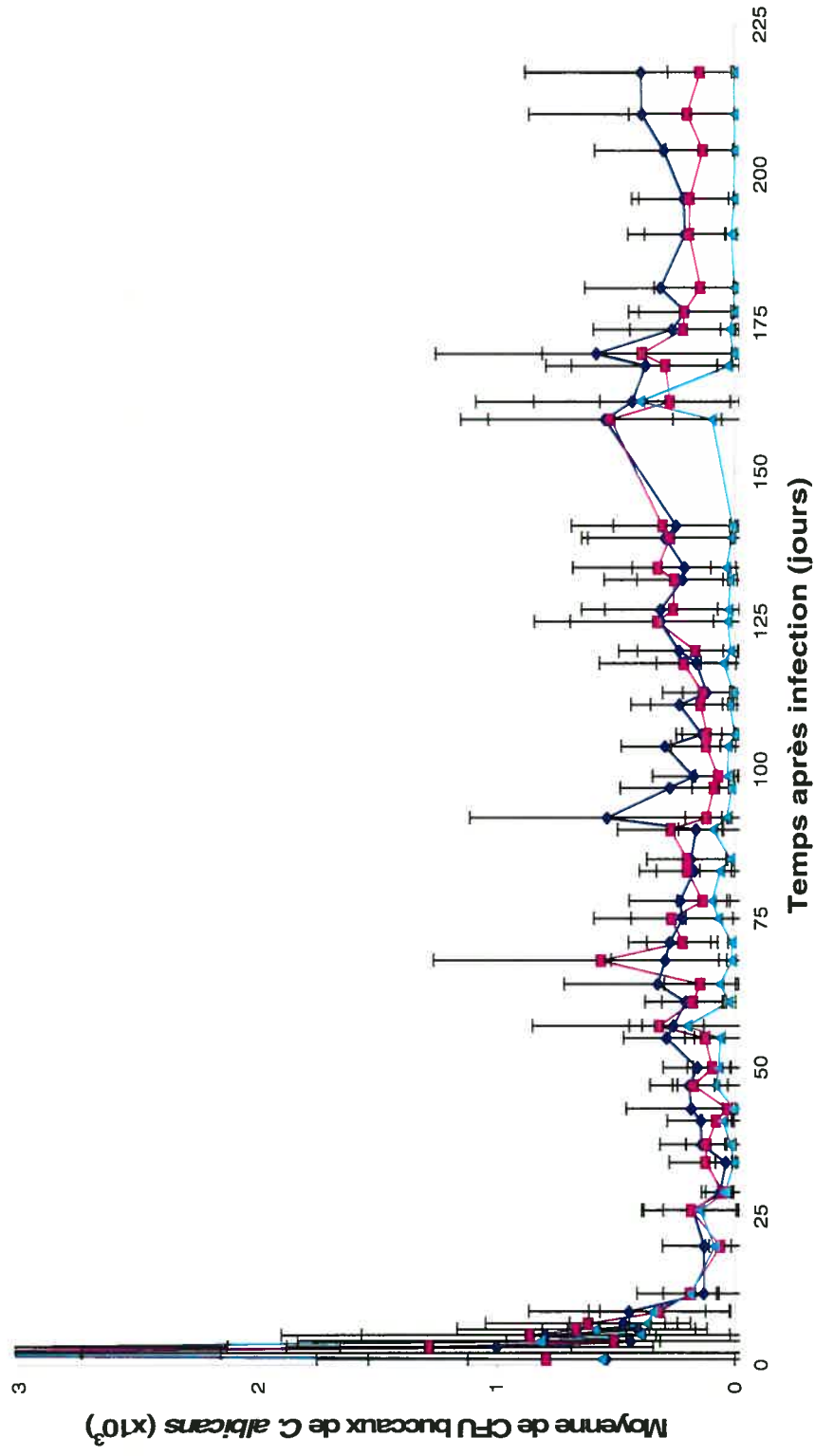


Figure 8: Charge buccale moyenne (CFU/ 2mL de solution de Ringer)  $\pm$  écart-type de *C. albicans* retrouvée chez des souris Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> (en turquoise), Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>-/-</sup> (en bleu foncé) et Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>+/-</sup> (en rose) entre les jours 1 et 217 post-infection.

CD4 expriment la protéine nef, une phase d'infection chronique est observée. En cours d'expérimentation, les charges buccales de ce groupe se sont avérées faibles mais ponctuées de récurrences. Les souris Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>-/-</sup> sont homozygotes quant à l'absence du récepteur CD8 à la surface de tous leurs lymphocytes. Suite à la primo-infection, ces souris demeurent porteuses de *C. albicans* au niveau buccal, avec une charge buccale moyenne près de  $4 \times 10^2$  cellules par 2 mL de solution de Ringer. Dans la même expérience, les souris Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>+/-</sup> ont aussi conservé des décomptes buccaux de la levure, révélant ainsi un état de porteur chronique.

### **Transfert adoptif de lymphocytes T CD8**

Lors de cette expérimentation, des souris Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>-/-</sup> ont reçu un transfert de lymphocytes T CD8, 217 jours après l'infection buccale à *C. albicans*. La but de cette expérimentation était d'observer si l'ajout de lymphocytes T CD8 fonctionnels était suffisant afin de réduire la charge buccale de *C. albicans* dans le contexte d'une infection chronique. Pour ce faire, les souris mentionnées lors de l'expérience précédente ont été utilisées. Quatre d'entre elles choisies aléatoirement ont reçu  $2,5 \times 10^6$  lymphocytes exprimant la molécule de surface CD8 et provenant de souris de lignée C3H, non-Tg. L'injection s'est faite par voie intraveineuse. À titre de contrôle, quatre souris Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>-/-</sup> ont reçu une injection de PBS, dans les mêmes conditions. La figure 9 montre les charges buccales moyennes de *C. albicans* dans les jours suivants le transfert cellulaire. Une analyse statistique (ANOVA) comparant le groupe expérimental au contrôle ne permet pas d'identifier une différence au niveau de la charge buccale de levures.

Par ailleurs, ces souris ont été sacrifiées au jour 64 suite au transfert et des décomptes de CFU de *C. albicans* dans les organes ont été établis. Les résultats sont présentés au tableau I. À ce moment, les charges de levures se sont avérées similaires pour les deux groupes. Dans les deux cas, les décomptes de *C. albicans* dans le tractus gastro-intestinal (estomac, petit et gros intestins) ont atteint plus de

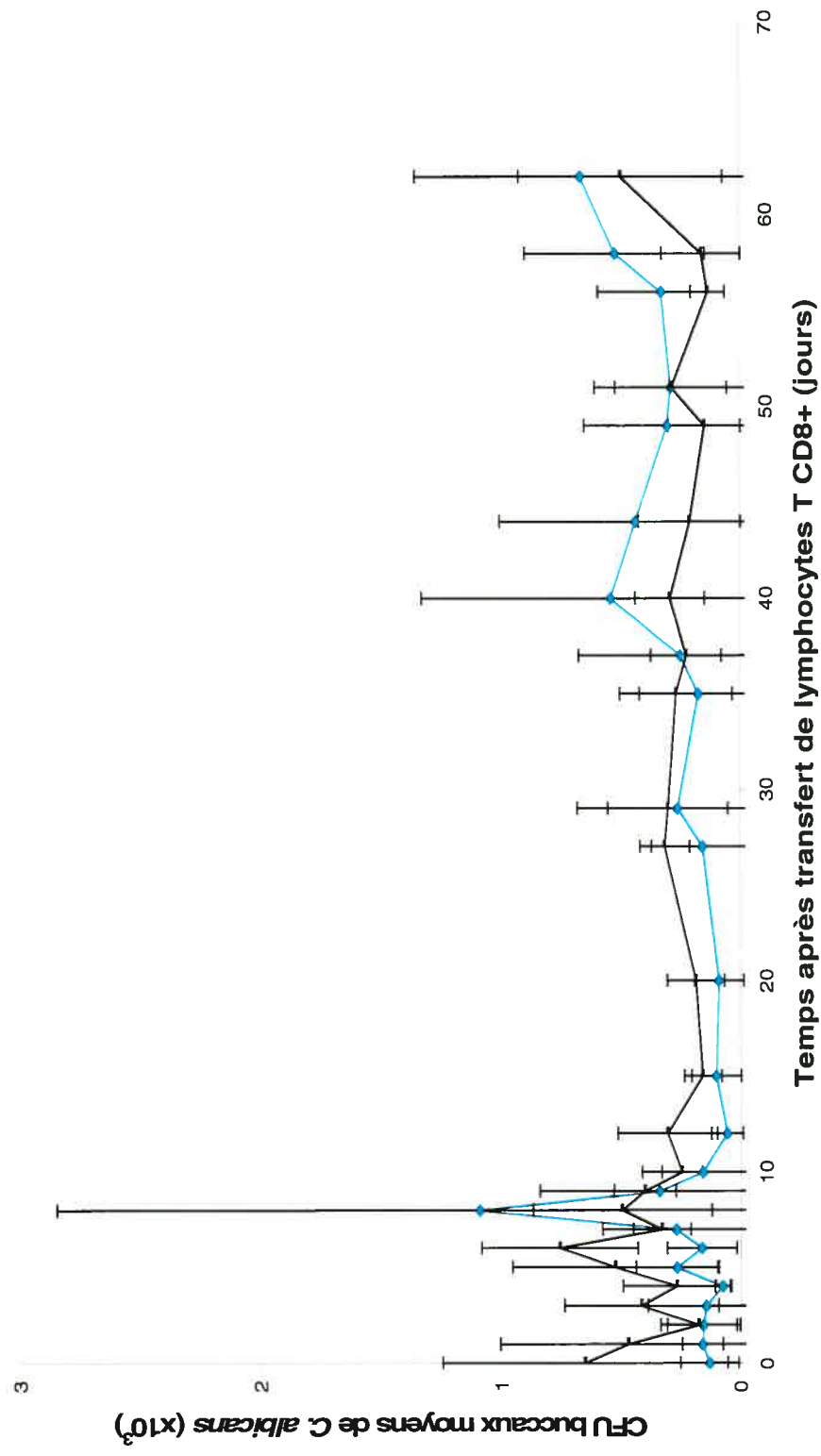


Figure 9: Charge buccale moyenne (CFU/ 2mL de solution de Ringer)  $\pm$  écart-type de *C. albicans* retrouvée chez des souris Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>+</sup> ayant reçu un transfert adoptif de lymphocytes T CD8 (en turquoise) ou de PBS (en noir), entre les jours 0 et 62 post-transfert.

Tableau II : Décompte des charges de *C. albicans* retrouvées dans les organes profonds de souris CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>-/-</sup>, 64 jours après avoir reçu un transfert adoptif de lymphocytes T CD8.

Variable	Souris CD4/HIV <sup>Nef</sup> CD8 <sup>-/-</sup>	
	Transfert CD8	PBS
Nb animaux inoculés	4	4
Organes infectés par <i>C. albicans</i> :		
Cerveau		
Nb d'animaux	3	1
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	36	147
Étendue	22-56	N/D
Poumons		
Nb d'animaux	2	1
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	48	430
Étendue	38-59	N/D
Foie		
Nb d'animaux	2	1
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	32	8
Étendue	24-41	N/D
Reins		
Nb d'animaux	2	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	76	N/D
Étendue	40-112	N/D
Estomac		
Nb d'animaux	4	4
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	1.7 x 10 <sup>5</sup>	2.2 x 10 <sup>5</sup>
Étendue	1.5 x 10 <sup>4</sup> -3.5 x 10 <sup>5</sup>	6.6 x 10 <sup>4</sup> -3.8 x 10 <sup>5</sup>
Petit intestin		
Nb d'animaux	4	4
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	4.4 x 10 <sup>4</sup>	8.8 x 10 <sup>3</sup>
Étendue	2.1 x 10 <sup>3</sup> -1.2 x 10 <sup>5</sup>	4.4 x 10 <sup>2</sup> -3.0 x 10 <sup>4</sup>
Gros intestin		
Nb d'animaux	4	4
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	5.0 x 10 <sup>4</sup>	4.6 x 10 <sup>4</sup>
Étendue	1.5 x 10 <sup>4</sup> -7.1 x 10 <sup>4</sup>	6.7 x 10 <sup>3</sup> -7.8 x 10 <sup>3</sup>

N/D , non-déecté



$3 \times 10^5$  cellules par gramme alors que peu ou pas de champignon n'a été retrouvé dans les organes profonds tels que le foie, les reins, les poumons et le cerveau.

### **Infection des souris Tg mCD4/HIV<sup>Nef</sup>**

Au cours de cette expérience, de jeunes souris Tg mCD4/HIV<sup>Nef</sup> ont été infectées avec *C. albicans*, parallèlement à un groupe contrôle non-Tg. Les animaux de cette lignée expriment le transgène sous le contrôle d'un promoteur CD4 murin, et ne possèdent pas le promoteur CD4 humain nécessaire à l'expression de la protéine Nef par les macrophages et les cellules dendritiques. Ainsi, chez ces souris, seuls les lymphocytes T CD4 expriment le transgène (résultats non publiés, laboratoire du Dr Paul Jolicoeur).

L'infection à *C. albicans* de ces animaux a été étudiée sur une période de 143 jours (résultats présentés à la figure 10). Après une primo-infection caractérisée par un pic de CFU, les souris Tg sont demeurées porteuses de façon chronique de la levure au niveau buccal, alors que les contrôles non-Tg l'ont éliminé. De rares récurrences ont pu être observées au fil de l'expérimentation chez les contrôles, ce qui peut être attribuable au fait que les animaux non-Tg conservent une faible charge de champignons dans l'estomac et les intestins. Les souris ont été sacrifiées et leurs organes profonds ont été disséqués et broyés afin d'y rechercher le *C. albicans*. Les résultats des décomptes de CFU retrouvés dans ces organes sont présentés au tableau II. Pour le groupe expérimental comme pour les témoins, aucune trace de levures n'a été retrouvée dans les organes profonds (foie, reins, poumons et cerveau) des souris. En ce qui concerne le système gastro-intestinal, des charges de *C. albicans* ont été retrouvées chez toutes les souris Tg, alors que seules deux souris non-Tg sur quatre ont présenté des décomptes positifs.

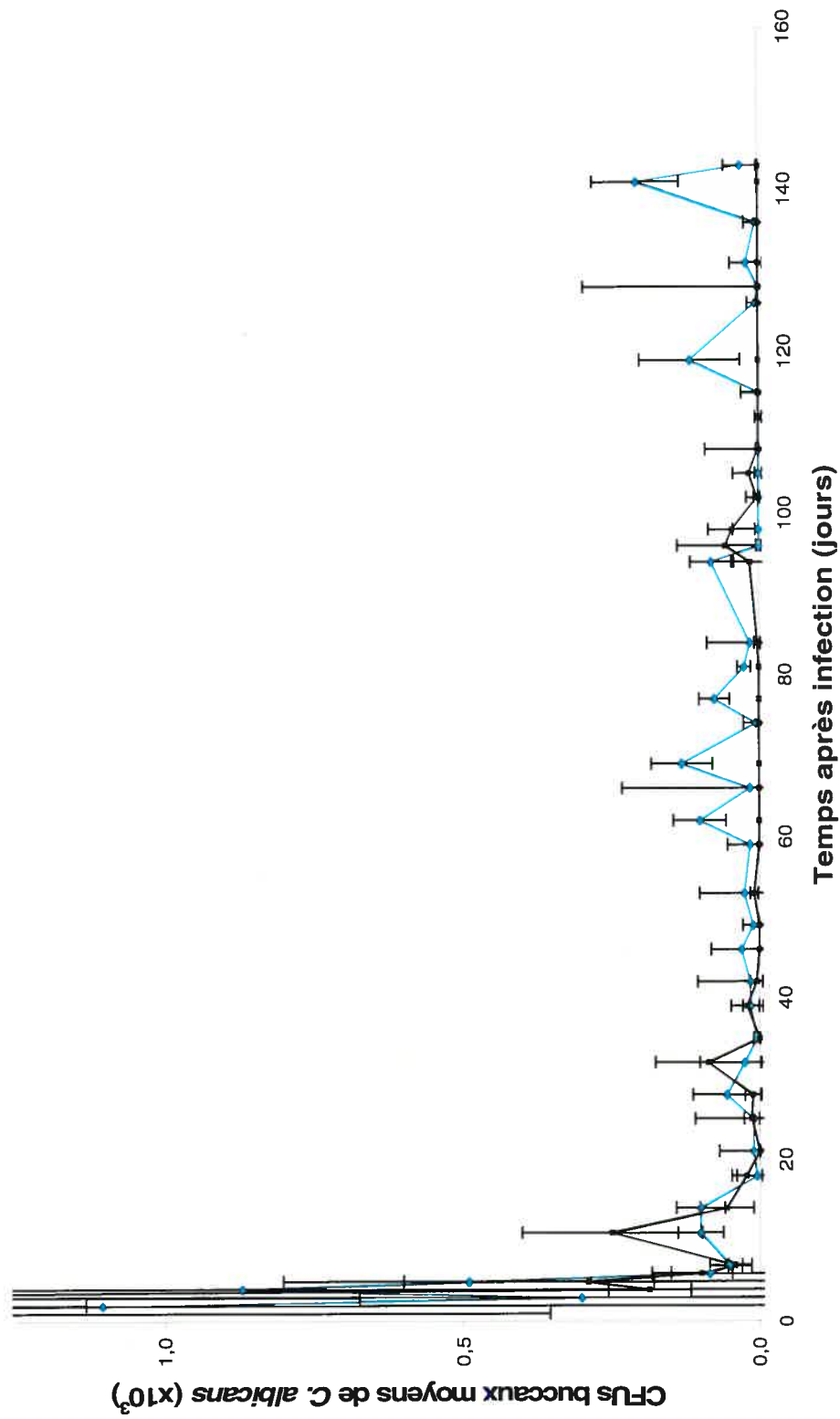


Figure 10: Charge buccale moyenne (CFU/ 2mL de solution de Ringer)  $\pm$  écart-type de *C. albicans* retrouvée chez des souris Tg mCD4/HIV<sup>Nef</sup> (en turquoise) et des souris non-Tg (en noir) entre les jours 1 et 143 post-infection.

Tableau III : Décompte des charges de *C. albicans* retrouvées dans les organes profonds de souris mCD4/HIV<sup>Nef</sup> et non-Tg, 143 jours après infection buccale

Variable	Souris	
	mCD4/HIV <sup>Nef</sup>	Non-Tg
Nb animaux inoculés	7	4
Jour moyen de l'âge à l'inoculation, (étendue)	132 (130-133)	130
Jour moyen de l'âge au sacrifice, (étendue)	275 (273- 276)	273
Organes infectés par <i>C. albicans</i> :		
Cerveau		
Nb d'animaux	0	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	N/D	N/D
Étendue	N/D	N/D
Poumons		
Nb d'animaux	0	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	N/D	N/D
Étendue	N/D	N/D
Foie		
Nb d'animaux	0	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	N/D	N/D
Étendue	N/D	N/D
Reins		
Nb d'animaux	0	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	N/D	N/D
Étendue	N/D	N/D
Estomac		
Nb d'animaux	7	2
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	$2.2 \times 10^5$	$1.5 \times 10^5$
Étendue	$2.5 \times 10^4$ - $4.9 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$ - $1,9 \times 10^5$
Petit intestin		
Nb d'animaux	7	2
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	$3.3 \times 10^3$	$7.2 \times 10^2$
Étendue	$6.5 \times 10^1$ - $1.1 \times 10^4$	$5.1 \times 10^2$ - $9.2 \times 10^3$
Gros intestin		
Nb d'animaux	7	2
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	$8.3 \times 10^3$	$6.4 \times 10^3$
Étendue	$1.2 \times 10^3$ - $2.3 \times 10^4$	$3.2 \times 10^3$ - $9.6 \times 10^3$

N/D, non-déecté

### Infection des souris Tg CD4F/HIV<sup>Nef</sup>

Un groupe de souris Tg CD4F/HIV<sup>Nef</sup> a été fourni par le laboratoire du Dr Jolicoeur. Chez ces animaux, la protéine nef est exprimée par les lymphocytes T CD4 ainsi que certaines cellules dendritiques de lignée lymphoïde (Hanna, Rebai et al. 2001). On a infecté six souris oralement à *C. albicans*, parallèlement à un groupe de six animaux non-Tg. L'expérimentation s'est déroulée sur une période de 120 jours, puis les souris ont été sacrifiées et les décomptes des CFU dans les organes profonds ont été relevés.

La figure 11 représente l'évolution moyenne de la charge buccale de champignon suite à l'infection. Alors que la phase de primo infection concorde avec le modèle antérieurement établi pour les souris non-Tg et Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup>, les résultats concernant la phase de porteur chronique semblent aberrants. En effet, on remarque des récurrences importantes de CFU chez les souris non-Tg utilisées en tant que témoin négatif, et ce tout au long de l'expérience. Aucune cause n'a pu formellement être associée à ces résultats. Tous les animaux non-Tg utilisés dans le cadre de cette expérimentation ont été génotypés à nouveau à leur décès afin de s'assurer qu'aucun d'eux n'était porteur du transgène. Ces observations inattendues pour les témoins mettent le doute sur toute conclusion que l'on pourrait tirer quant aux souris Tg CD4F/HIV<sup>Nef</sup>. Néanmoins, il semble que ces animaux Tg demeurent porteurs d'une faible charge buccale de *C. albicans*, souvent indétectable selon notre technique d'écouvillonnage.

Lors du sacrifice des animaux, les décomptes de levures dans les organes ont été établis. Ceux-ci sont représentés au tableau III. Chez les souris Tg ainsi que non-Tg, aucun *C. albicans* n'a été retrouvé dans le foie, les reins, les poumons et le cerveau. Cinq souris Tg sur six étaient porteuses de *C. albicans* au niveau du gros intestin, alors qu'une seule souris Tg présentait des traces du champignon dans tout le système gastro-intestinal. Il est possible que cet animal, pour une raison indéfinie,

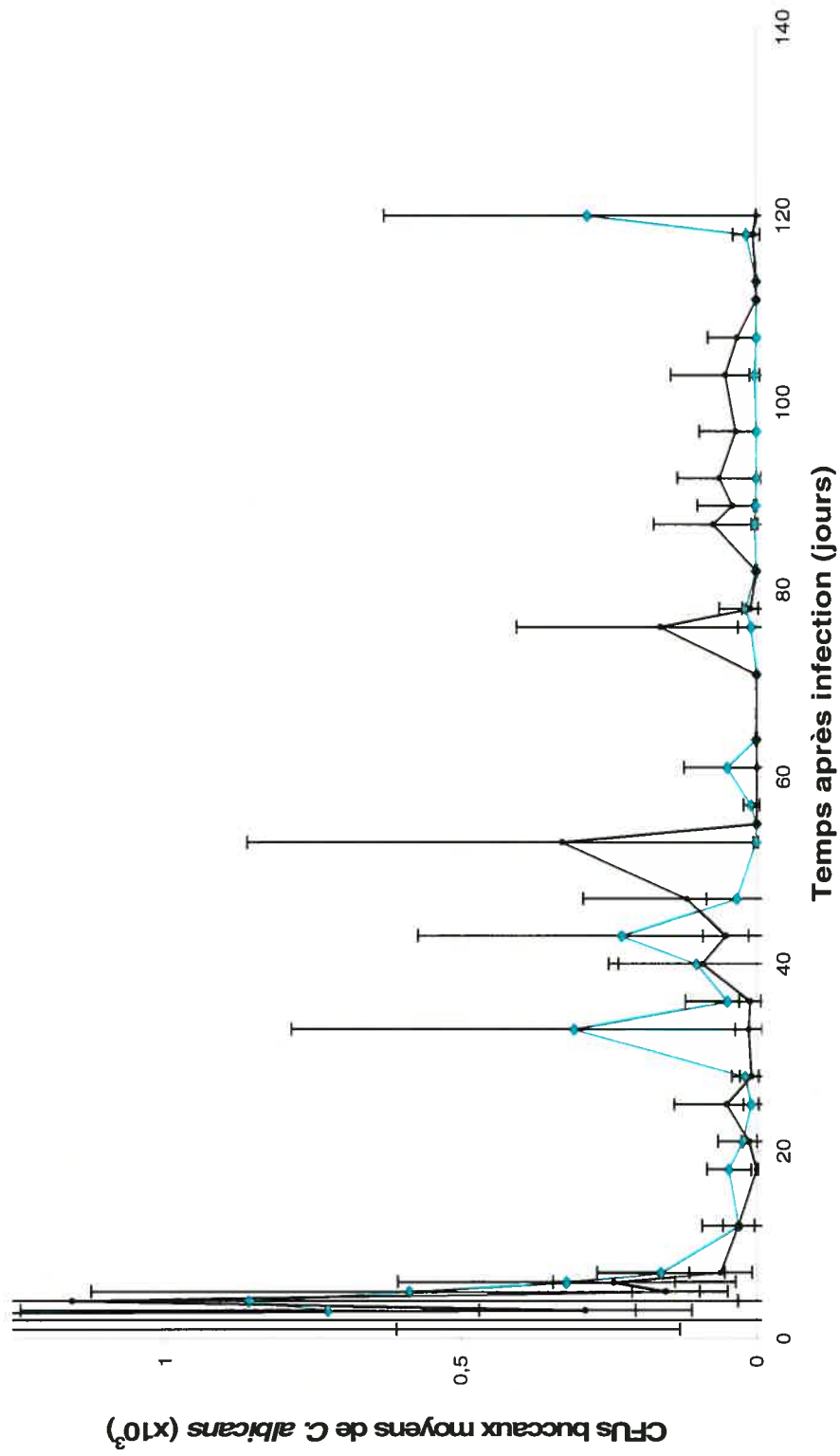


Figure 11: Charge buccale moyenne (CFU/ 2mL de solution de Ringer)  $\pm$  écart-type de *C. albicans* retrouvée chez des souris Tg CD4F/HIV<sup>Nef</sup> (en turquoise) et des souris non-Tg (en noir) entre les jours 1 et 120 post-infection.

Tableau IV : Décompte des charges de *C. albicans* retrouvées dans les organes profonds de souris CD4F/HIV<sup>Nef</sup> et non-Tg, 120 jours après infection buccale

Variable	Souris	
	CD4F/HIV <sup>Nef</sup>	Non-Tg
Nb animaux inoculés	6	6
Jour moyen de l'âge à l'inoculation, (étendue)	41	42 (41-42)
Jour moyen de l'âge au sacrifice, (étendue)	160 (159-161)	161 (159-162)
Organes infectés par <i>C. albicans</i>		
Cerveau		
Nb d'animaux	0	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	N/D	N/D
Étendue	N/D	N/D
Poumons		
Nb d'animaux	0	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	N/D	N/D
Étendue	N/D	N/D
Foie		
Nb d'animaux	0	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	N/D	N/D
Étendue	N/D	N/D
Reins		
Nb d'animaux	0	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	N/D	N/D
Étendue	N/D	N/D
Estomac		
Nb d'animaux	4	1
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	$7.1 \times 10^4$	$4.7 \times 10^3$
Étendue	$9.6 \times 10^2$ - $2.8 \times 10^5$	N/D
Petit intestin		
Nb d'animaux	4	1
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	$5.2 \times 10^2$	$4.6 \times 10^3$
Étendue	$3.8 \times 10^1$ - $1.5 \times 10^3$	N/D
Gros intestin		
Nb d'animaux	5	1
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , en cfu/g	$3.4 \times 10^3$	$1.4 \times 10^5$
Étendue	$5.2 \times 10^2$ - $1.3 \times 10^4$	N/D

N/D, non-déecté

soit demeuré porteur du champignon de façon chronique, ce qui aurait entraîné des décomptes chez tous ses compagnons de cage dû à une coprophagie usuelle chez cette espèce.

### Évaluation de la phagocytose des PMNs

Des études de phagocytose de *C. albicans* par les PMNs ont été effectuées chez des souris CD4C/HIV<sup>MutA</sup>. Lors de chaque expérience, quatre groupes de souris étaient comparés, soient des animaux Tg, non-Tg, ainsi que Tg et non-Tg infectés au niveau de la muqueuse buccale avec *C. albicans*. De plus, ces expérimentations ont été faites sur des animaux infectés depuis 7 ou 70 jours, afin d'évaluer la contribution de l'âge et de l'infection chronique sur la fonction des PMNs. Finalement, différents ratios PMN : *C. albicans* ont été testés. L'utilisation d'un cytomètre de flux (FacsCalibur) nous a permis d'évaluer quantitativement la proportion de PMNs ayant internalisé une/des levures. Il a aussi été possible de discriminer les phagocytes ayant ingéré *C. albicans* de ceux qui lui étaient simplement adhérents en ajoutant à la suspension cellulaire un colorant se liant exclusivement aux levures situées à l'extérieur des cellules. Lors de chaque expérience, les cellules de plusieurs souris étaient mises en commun selon leur groupe, puis plusieurs échantillons (deux à quatre) étaient analysés afin d'observer la variation intra-groupe. De même, chaque expérience de phagocytose a été reprise un minimum de trois fois afin de considérer les variations pouvant survenir d'une journée à l'autre.

Les résultats obtenus suite à ces expérimentations sont présentés à la figure 12. La section A représente les résultats obtenus chez les souris infectées depuis 7 jours à *C. albicans*, alors que la section B nous renseigne quant à la fonction phagocytaire des PMNs de souris infectées depuis 70 jours. Une analyse statistique (procédure mixte) globale permet de déterminer qu'à 7 jours, aucune différence n'est observable entre les différents groupes, ce à tous les ratios. Par ailleurs, après 70 jours d'infection, on remarque une diminution significative ( $P < 0.05$ ) de la phagocytose des

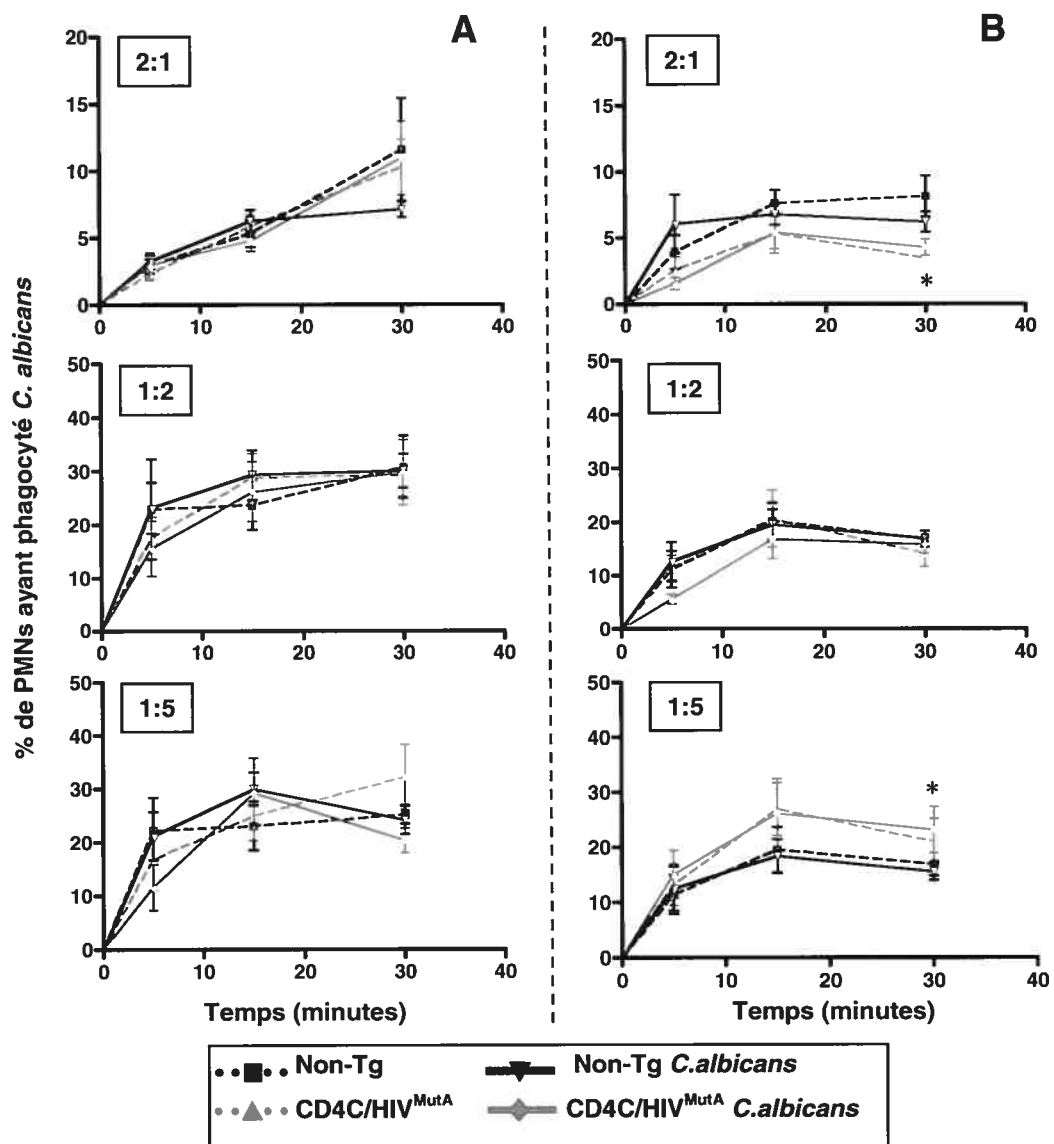


Figure 12 : Phagocytose de *C. albicans* par des PMNs de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, infectées ou non à *C. albicans*, (A) 7 jours ou (B) 70 jours après infection buccale. \*, P<0.05



groupes Tg vs non-Tg, après 30 minutes pour un ratio PMNs : *C. albicans* de 2 :1. Cette situation est inversée à un ratio de 1 :5, alors qu'après 30 minutes la fonction phagocytaire des groupes Tg est augmentée.

### **Évaluation de l'activité fongicide des PMNs**

Les PMNs de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> ont été utilisés afin de procéder à des tests de fongicidie à l'égard de *C. albicans*. Les groupes expérimentaux représentés sont les mêmes que lors des épreuves de phagocytose, soit Tg et non-Tg, infectés ou non à *C. albicans*. De plus, nous avons aussi pris en considération l'âge des animaux en les sacrifiant après 7 ou 70 jours d'infection. Cette fois, un seul ratio PMN : *C. albicans* a été utilisé, des résultats préliminaires ayant démontré que ce facteur n'influençait pas les résultats. Il a été possible de déterminer quantitativement la proportion de *C. albicans* tuée grâce au cytomètre en flux (FacsCalibur). En effet, après des temps de contact déterminés, nous avons fait éclater les phagocytes puis avons ajouté un colorant à la suspension de *C. albicans*. Seules les cellules rendues perméables (inactivées) ont été colorées. Lors de cette expérimentation, les cellules de souris appartenant à un même groupe ont été mises en commun, et plusieurs (2 à 4) échantillons ont été analysés. Chaque expérience a de plus été reprise un minimum de trois fois en des jours différents.

Les résultats obtenus concernant l'activité fongicide des PMNs à l'égard de *C. albicans* sont démontrés à la figure 13. Une analyse statistique (analyse de variance par Proc Mixed) a démontré que, après 7 jours d'infection buccale à *C. albicans*, la fongicidie des PMNs provenant des groupes de souris Tg est significativement diminuée ( $P < 0.05$ ) par rapport aux groupes non-Tg. Par ailleurs, 70 jours après infection, aucune différence significative n'est observée entre les différents groupes.

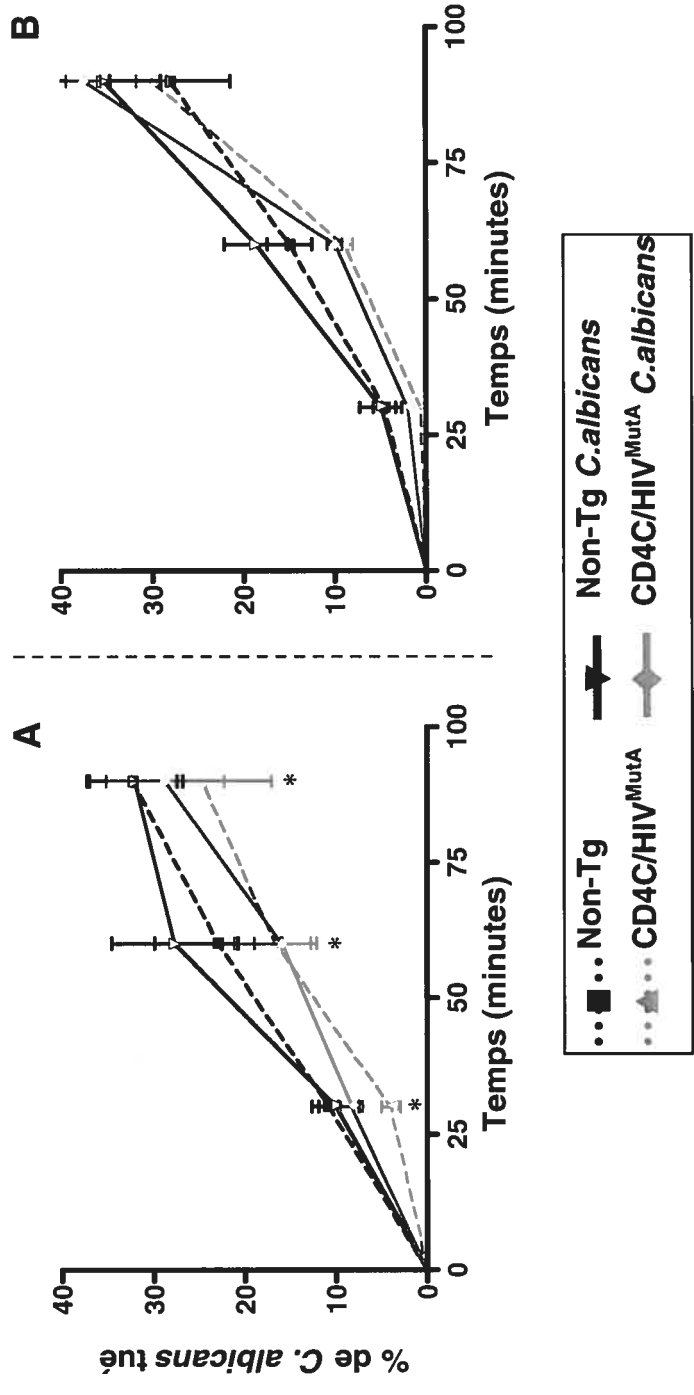


Figure 13 : Activité fongicide à l'égard de *C. albicans* de PMNs circulants de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, infectées ou non à *C. albicans*, (A) 7 jours ou (B) 70 jours après infection buccale. \*, P<0.05

### Énumération des leucocytes péritonéaux

La proportion des différents types cellulaires présents dans la cavité péritonéale a été quantitativement évaluée chez des souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, de 2 ou 4 mois, ayant reçu une injection de thioglycolate de sodium trois jours précédent l'expérience. Chaque groupe de souris était composé d'un minimum de 6 animaux dont les cellules provenant de l'exsudat péritonéal ont été mises en commun. La discrimination des cellules a été réalisée sur un base morphologique, suite à leur fixation sur lame (Cytospin) ainsi qu'à une coloration permettant d'observer les organelles (coloration de Giemsa). Deux lames ont été préparées pour chaque groupe, puis deux fois 100 cellules ont été dénombrées sur chaque lame. Les pourcentages moyens obtenus sont présentés au tableau IV. Selon les résultats obtenus, les pourcentages de macrophages entre les différents groupes varient de 77,25 à 79,25%. Le faible écart observé entre les souris Tg et non-Tg permet de s'assurer qu'il n'y a pas de biais dans l'analyse des résultats des expériences fonctionnelles subséquentes concernant les macrophages péritonéaux.

Tableau V : Énumération des différents types cellulaires retrouvés dans l'exsudat péritonéal de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, de 2 ou 4 mois, trois jours après injection au thioglycolate de sodium.

Souris	Âge	Nb	% moyen de cellules provenant d'exsudat péritonéal			
			Neutrophiles	Lymphocytes	Éosinophiles	Macrophages
Tg	2 mois	8	2.25	15.25	3.25	<b>79.25</b>
CD4C/HIV <sup>MutA</sup>	4 mois	6	1	20.25	1.25	<b>77.5</b>
Non-Tg	2 mois	8	5.5	14	1.25	<b>79.25</b>
	4 mois	6	1.25	21	0.5	<b>77.25</b>

## Évaluation de la phagocytose par les macrophages (MΦ) péritonéaux

Lors des expériences de phagocytose de *C. albicans* par les macrophages péritonéaux, deux groupes expérimentaux par tranche d'âge ont été utilisés, soit les souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg. Les tests ont été exécutés sur des animaux âgés de 7 semaines ou 4 mois, ce qui correspond aux âges de souris infectées pour 7 ou 70 jours. Dans ce cas ci aucune souris infectée au niveau de la muqueuse buccale avec *C. albicans* n'a été étudiée puisque dans notre modèle, les macrophages péritonéaux ne rencontrent pas la levure. Les résultats ont été obtenus par cytométrie en flux, les conditions et le design des expériences étant les mêmes que lors de l'évaluation de la phagocytose par les PMNs. Encore une fois, les résultats présentés sont le fruit d'un minimum de 3 expériences indépendantes, ce pour chaque âge.

La figure 14 représente les résultats obtenus pour les souris de 2 et 4 mois (tableau A et B, respectivement). L'analyse statistique (Proc Mixed) des résultats permet de conclure qu'à tout temps, tout ratio et tout âge, la phagocytose de *C. albicans* est augmentée chez les macrophages péritonéaux provenant de souris Tg ( $P < 0.05$ ). Par ailleurs, il est intéressant d'observer que l'on retrouve aussi un effet âge important puisque les 2 groupes expérimentaux (Tg vs non-Tg) voient leur activité phagocytaire augmenter avec la maturité.

## Évaluation de l'activité fongicide des PECs

Les expériences de fongicidie des PECs se déroulent de la même façon que pour les PMNs, à la différence que les deux seuls groupes expérimentaux utilisés ici sont les souris Tg vs non-Tg. Le terme PECs est utilisé en remplacement de macrophages puisque, comme les cellules de souris sont lysées avant l'analyse des résultats par cytométrie, il est impossible de savoir si ce sont bel et bien les macrophages péritonéaux, ou toutes autres cellules présentes dans la cavité péritonéale, qui ont tué le *Candida*. Cependant, puisque les macrophages représentent

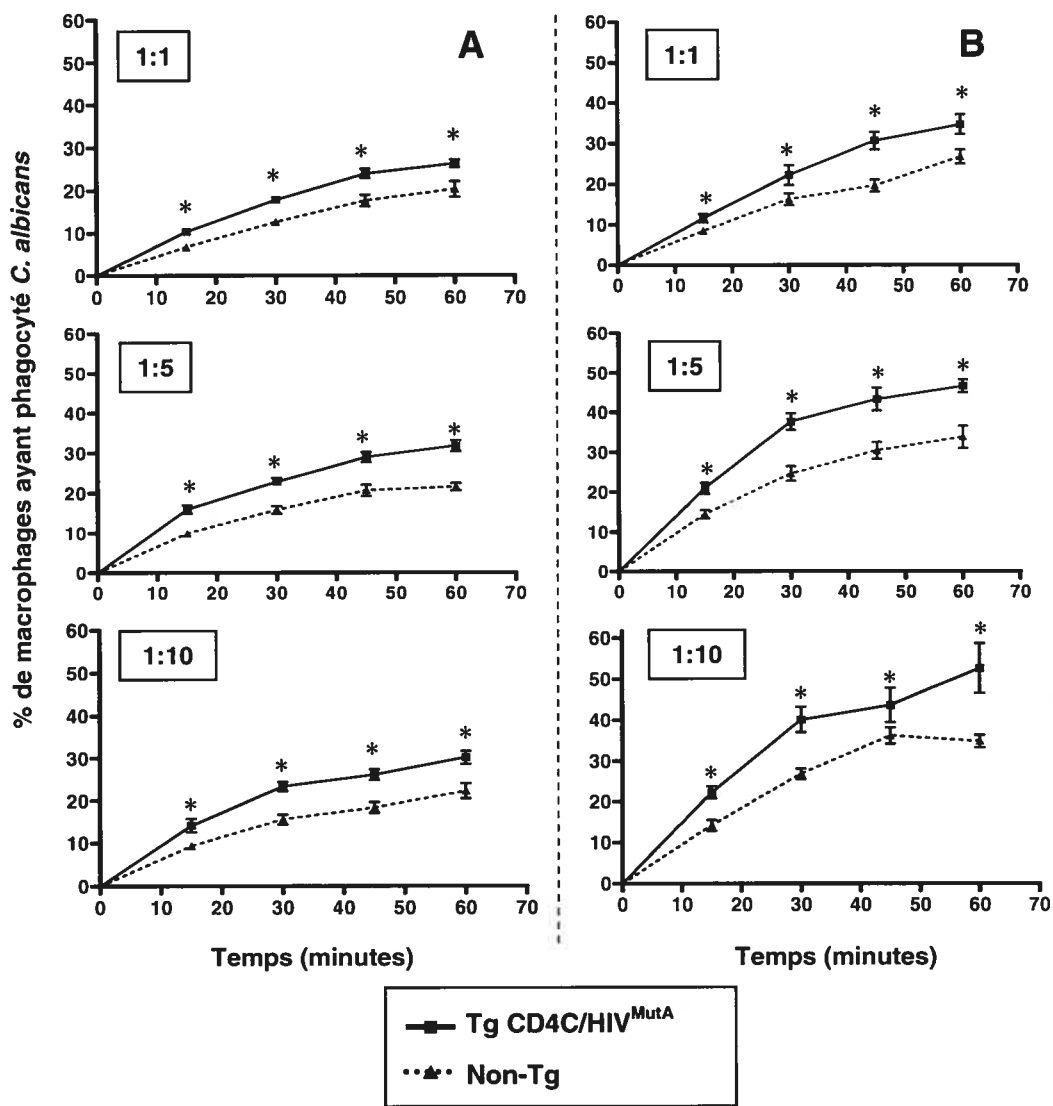


Figure 14: Phagocytose de *C. albicans* par des macrophages de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, (A) de 2 ou (B) 4 mois. \*, P < 0.05

de 77 à 79% des cellules présentes et que seuls les PMNs (1 à 6%) exercent aussi directement et rapidement une action fongicide, nous considérons que l'inactivation du champignon dans cette expérience est due à l'activité des macrophages péritonéaux. Encore une fois, un minimum de trois expériences indépendantes ont été effectuées.

La figure 15 présente les résultats obtenus lors de l'étude de l'activité fongicide par les PECs, à l'égard de *C. albicans*. On y retrouve le pourcentage de *Candida* ayant été perméabilisé par les cellules provenant de l'exsudat péritonéal des souris des différents groupes expérimentaux. Après analyse statistique (ANOVA), on ne peut conclure à aucune différence significative quand à l'activité fongicide des PECs de souris Tg vs non-Tg. Seules les PECs de souris transgéniques de 4 mois, au temps de 30 minutes, présentent une activité fongicide accrue comparativement aux souris non-Tg ( $p < 0,05$ ). Comme ce résultat n'est obtenu que pour un seul temps, il est possible qu'il n'ait pas de signification biologique particulière. Par ailleurs, il n'a pas été démontré que l'âge des animaux exerçait un effet sur la fonction des cellules lors de cette expérience.

### **Détection de la production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par les macrophages péritonéaux**

Quatre groupes expérimentaux ont été évalués quant à la production extracellulaire de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, soient les souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, à 2 ou 4 mois. Pour cette expérience, les PECs prélevées ont été mises en commun selon le groupe puis les macrophages péritonéaux ont été isolés par adhérence en plaque. Quatre conditions ont été testées, c'est-à-dire en incubant pendant 2 heures les cellules seules, en présence de NaOH, en présence de PMA ou avec  $8 \times 10^5$  cellules de *C. albicans* viable. L'ajout de NaOH a permis d'obtenir un témoin négatif, alors que le PMA a servi de contrôle positif de réaction. Lors de chaque expérience, les résultats ont été obtenus en plusieurs copies (de 2 à 8 selon le nombre de cellules

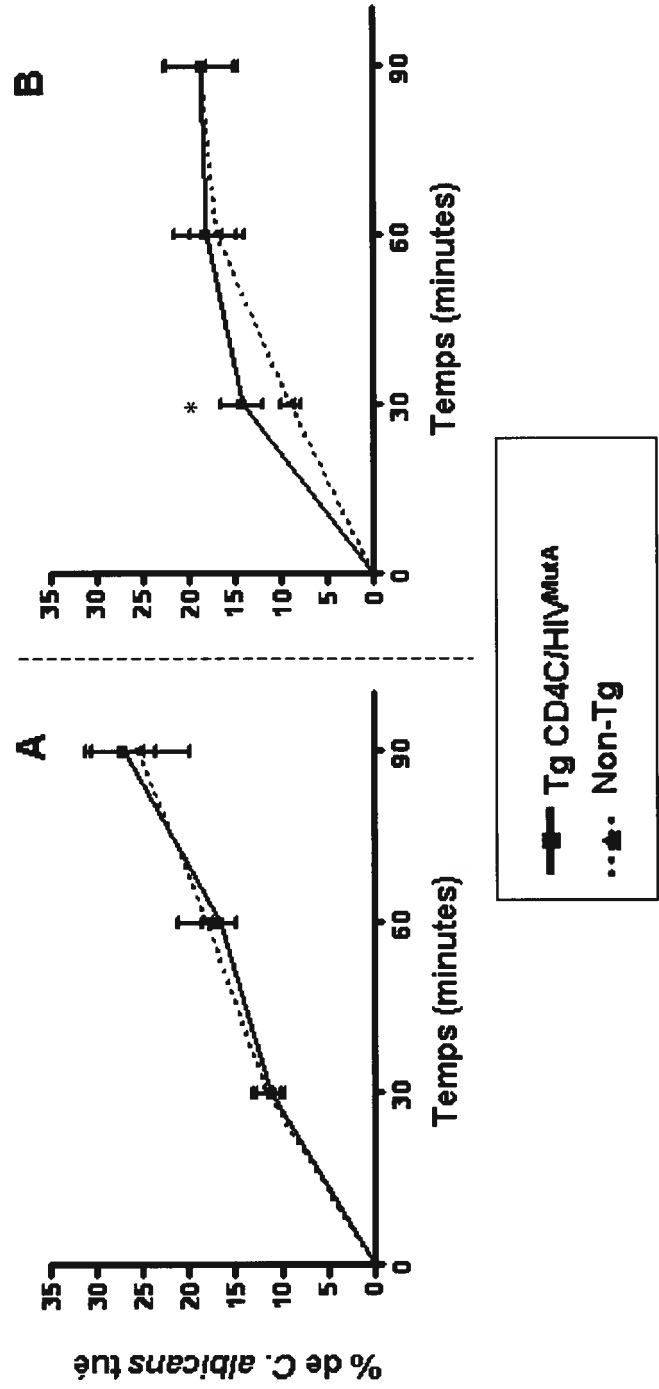


Figure 15 : Activité fongicide de macrophages péritonéaux de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, (A) de 2 ou (B) 4 mois, à l'égard de *C. albicans*. \* P<0.05

cellules disponibles), et chaque expérimentation a été reprise un minimum de trois fois de façon indépendante.

Les résultats obtenus sont présentés à la figure 16. Les analyses statistiques (ANOVA) démontrent que, chez les souris jeunes (2 mois), il n'y a pas de différence notable entre les groupes Tg vs non-Tg, lorsque les cellules sont incubées seules, en présence de NaOH ou de PMA. Lorsque *C. albicans* est ajouté aux cellules, la quantité d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> totale produite par les macrophages péritonéaux atteint 18 µM chez les souris Tg, alors qu'elle n'est que de 11 µM chez les non-Tg. Cependant, le très grand écart type rend les 2 groupes similaires d'un point de vue statistique. Chez les souris plus âgées, les résultats pour les deux groupes sont à nouveau comparables lorsque l'on étudie les macrophages incubés seuls, avec NaOH ou PMA. Lorsqu'on ajoute *C. albicans*, on observe toutefois l'inverse de la situation décrite chez les souris de 2 mois, c'est-à-dire que l'activité des animaux Tg est diminuée par rapport aux non-Tg. Encore une fois, le grand écart type observé ne permet pas de conclure à une différence statistiquement significative. Il est intéressant de noter que, chez les souris de 2 et 4 mois, l'incubation en présence de PMA n'a pas favorisé la sécrétion de peroxyde d'hydrogène chez les souris Tg et non-Tg.

### **Détection de la production de NO par les macrophages péritonéaux**

Lors des expériences visant la détection de la production extracellulaire de NO par les macrophages péritonéaux, nous avons utilisé les mêmes groupes expérimentaux que lors des tests de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Les incubations de macrophages isolés ont duré 48 heures, en présence L-Nmmla, d'IFN-γ, de 4x10<sup>5</sup> cellules de *C. albicans* inactivé ou seuls. Un minimum de trois expériences individuelles ont été faites pour chaque âge, au cours desquelles chaque condition testée était représentée plus d'une fois. Le L-Nmma a été utilisé en tant qu'inhibiteur de production de NO (témoin négatif) alors que l'IFN-γ est reconnu comme activateur de l'iNOS (témoin positif).



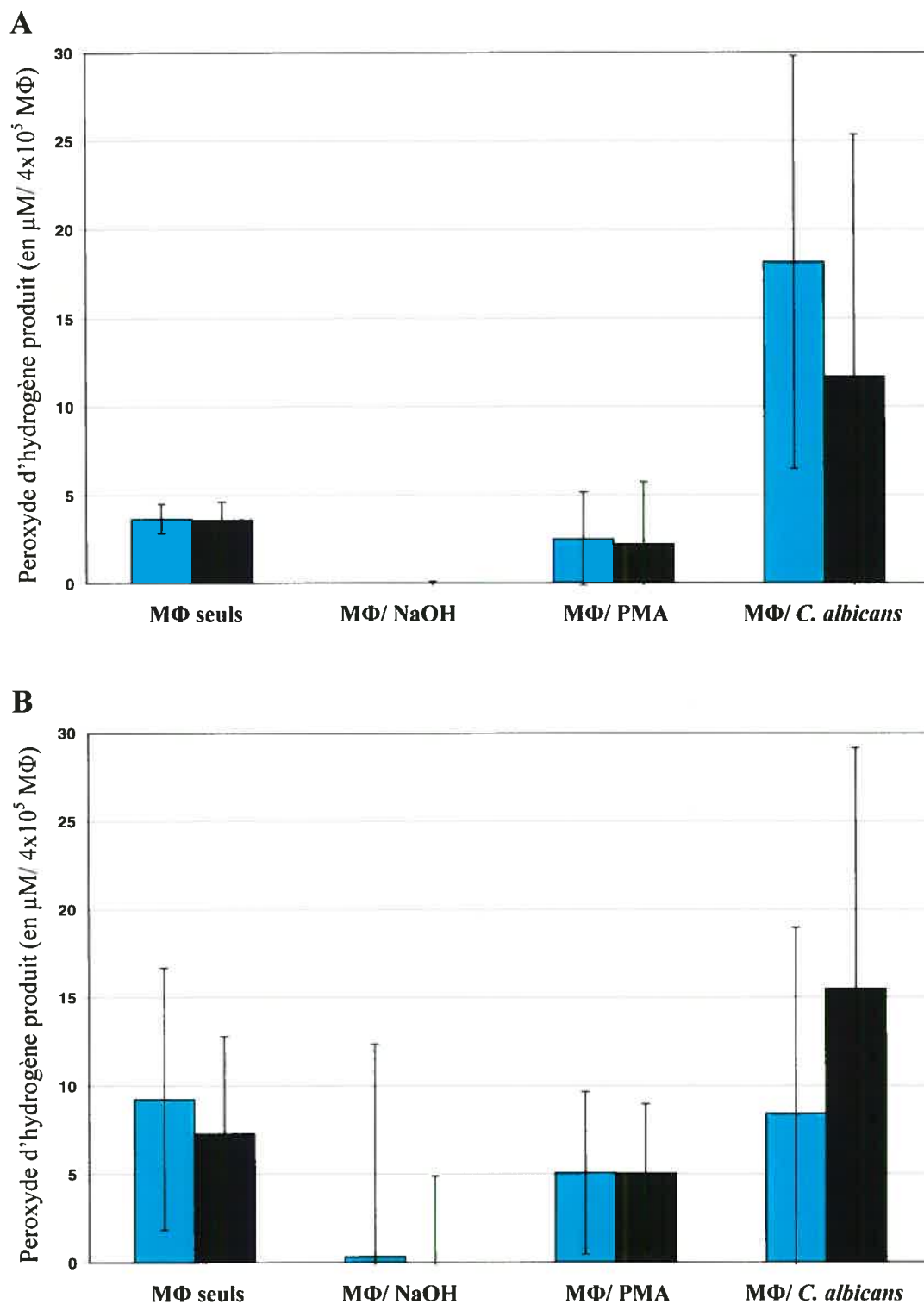


Figure 16 : Production de peroxyde d'hydrogène par les macrophages péritonéaux de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> (en turquoise) et non-Tg (en noir), exposées au NaOH, au PMA et à *C. albicans* viable pendant 2 heures, (A) à 2 mois ou (B) à 4 mois. \*, P < 0.05

Les résultats obtenus sont présentés à la figure 17. On observe chez les souris de 2 mois, au tableau A, une diminution statistiquement significative de la production de NO chez le groupe Tg par rapport au groupe non-Tg, en présence d'IFN- $\gamma$  ou de *C. albicans*. Lorsque les cellules sont incubées seules ou en présence de L-Nmmla, les résultats sont similaires entre les groupes expérimentaux. Chez les souris de 4 mois, on remarque une diminution notable de la production de NO par les souris Tg par rapport aux non-Tg lorsque les macrophages sont incubés en présence d'IFN- $\gamma$  seulement. Les résultats sont cependant similaires entre les deux groupes lorsque les macrophages sont seuls, en présence de L-Nmmla ou de *C. albicans*. À tous les âges et pour tous les groupes, le L-Nmmla a permis de réduire le niveau de NO produit alors que l'IFN- $\gamma$  a eu l'effet contraire en augmentant la production d'oxyde nitrique.

### **Déplétion des macrophages**

Des expériences de déplétion des macrophages ont été initiées en vue d'observer l'impact sur les charges buccales de *C. albicans* dans des conditions d'infection. Le tableau V montre les résultats de tests préliminaires effectués sur des souris de 2 mois, non-Tg. Alors que la littérature suggère une injection intra-veineuse de 1mg de carraghénane afin d'entraîner la déplétion des macrophages, il semble que la lignée de souris C3H présente une susceptibilité particulière rendant impossible l'administration d'une dose aussi grande de produit. En effet, les animaux injectés deviennent amorphes, moribonds puis décèdent. Comme leur estomac est gonflé et rempli de nourriture à l'autopsie, il a été suggéré par le vétérinaire que la carraghénane en forte concentration provoque un iléus chez nos souris, la paralysie des intestins rendant impossible le passage de la nourriture. Nous avons donc tenté de diminuer la dose injectée, ce qui a eu pour effet de réduire le pourcentage de déplétion de macrophages dans la rate et la muqueuse buccale (vérifié par cytométrie en flux). Une expérience subséquente lors de laquelle 0,75mg de carraghénane a été

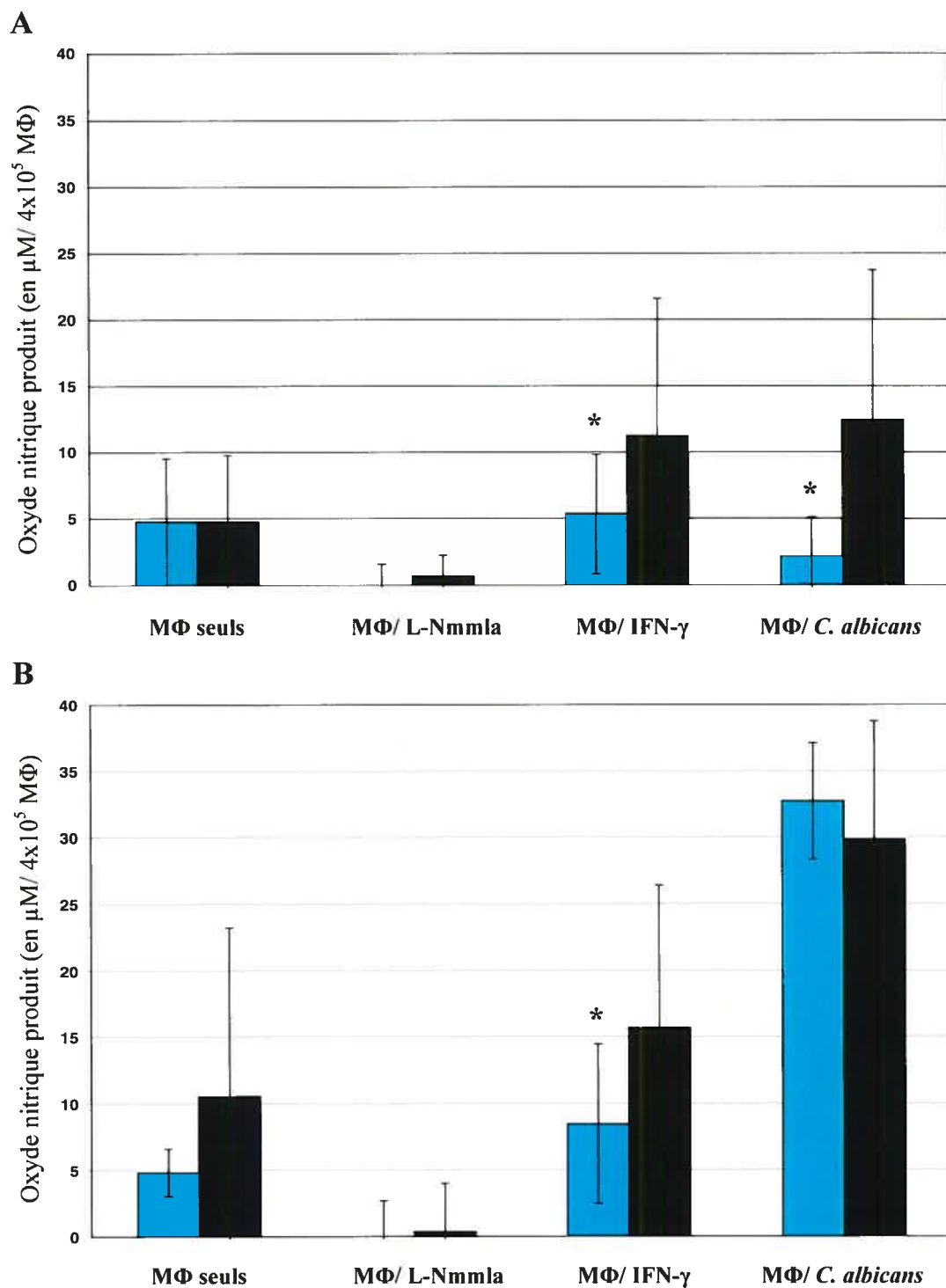


Figure 17 : Production d'oxyde nitrique par les macrophages péritonéaux de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> (en turquoise) et non-Tg (en noir), exposées au L-Nmmla, à l'IFN- $\gamma$  et à *C. albicans* inactivé pendant 48 heures, (A) à 2 ou (B) 4 mois d'âge. \*, P < 0.05

administré à des souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> infectées oralement à *C. albicans* depuis 12 jours (ie après la primo-infection), a provoqué le décès des animaux à l'intérieur des 48 heures suivant l'injection. Cette expérimentation a donc été abandonnée, dans l'attente d'un produit moins agressant pour les animaux.

Tableau VI : Bilan de santé des animaux et évaluation de la déplétion des macrophages provenant de la rate ou de la muqueuse buccale, chez des souris non-Tg, suite à l'injection i.v. de PBS, de 0.5mg ou de 1.0mg de carraghénane.

	PBS 200 mL/souris	Produit injecté Carraghénane	
		0.5 mg/souris	1.0 mg/souris
Nb d'animaux	4	5	7
État de santé après 48 heures	Très bien	Animaux amorphes	Points limites atteints chez presque tous les animaux*
% de macrophages de la rate	9.37	5.42	2.69
<b>% de déplétion</b>	-	<b>42%</b>	<b>71%</b>
% de macrophages de la muqueuse buccale	11.36	7.20	5.96
<b>% de déplétion</b>	-	<b>37%</b>	<b>48%</b>

\* Points limites : L'animal souffre de déshydratation, a de la difficulté à se déplacer, a le dos courbé et semble constamment amorphe

## Discussion

Le modèle de souris transgénique utilisé au cours des diverses expérimentations présente une maladie génétiquement induite mimant les manifestations cliniques associées à l'infection au VIH-1 chez l'homme. Parmi ces manifestations, notons la déplétion des lymphocytes T CD4, l'atrophie et la fibrose des organes lymphoïdes, l'amaigrissement, l'affection rénale ainsi qu'une mort prématurée (Hanna, Kay et al. 1998). Tel que décrit dans la littérature (de Repentigny, Aumont et al. 2002), nous avons observé que les souris CD4C/HIV<sup>MutA</sup> portent chroniquement *C. albicans* au niveau buccal, alors que les animaux non-Tg éliminent le champignon dans les quelques jours suivant la phase de primo-infection (figure 7). Cette constatation accentue la ressemblance du modèle aux patients présentant un stade avancé d'infection au VIH-1 et justifie son utilisation afin d'obtenir une meilleure compréhension des désordres immunologiques sous-jacents à l'infection. En effet, il semble que l'expression des gènes *rev*, *env* et *nef* du VIH-1 par les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4 ainsi que les macrophages entraîne suffisamment d'altérations en nombre et en fonction chez ces types cellulaires pour recréer la candidose oropharyngée lorsque le champignon est expérimentalement introduit chez l'animal. L'induction et/ou la répression de cytokines par le transgène peuvent de plus agir de façon indirecte sur des populations cellulaires effectrices (ex : PMNs) n'exprimant pas les gènes du VIH-1 (Marquis, Lewandowski et al. 2006).

De nombreuses données expérimentales viennent aujourd'hui approfondir nos connaissances quant aux altérations subies par les cellules dendritiques chez la souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup>. Le nombre de ces cellules est significativement diminué chez cette souris, de même que l'expression de la molécule du CMH-II à leur surface (Lewandowski, Marquis et al. 2006). Ces résultats suggèrent un défaut potentiel de présentation antigénique par les cellules dendritiques de ces souris transgéniques. Par ailleurs, la capacité de production d'IL-12 par les DC a aussi été démontrée comme étant réduite en réponse à *C. albicans*, reflétant un défaut au niveau de l'initiation

d'une réponse protectrice de type Th1 (Lewandowski, Marquis et al. 2006). Les altérations des lymphocytes T CD4 ont aussi été investiguées par les mêmes auteurs, et il a été démontré que ces cellules, en plus d'être réduites en nombre, étaient incapables de proliférer in vitro en réponse à *C. albicans*. Il a été démontré que le transfert adoptif de lymphocytes T CD4 provenant de souris non-Tg chez des animaux Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> infectés à *C. albicans* permet de réduire le nombre de levures au niveau buccal (Lewandowski, Marquis et al. 2006). Ces résultats démontrent que les lymphocytes T CD4 se situent au centre du défaut d'orchestration d'une réponse immunitaire protectrice Th1. Il demeure toutefois primordial de comprendre les voies menant à l'absence de protection par les cellules effectrices impliquées dans la défense contre *C. albicans*.

Afin de confirmer certains résultats déjà publiés et d'investiguer plus attentivement le rôle protecteur potentiel des lymphocytes T CD8 dans la candidose oropharyngée, des souris CD4C/HIV<sup>Nef</sup> n'exprimant pas la molécule de surface CD8 (CD8<sup>-/-</sup>) ont été infectées à *C. albicans*. Nous avons observé une augmentation de la charge buccale moyenne chez les souris Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>-/-</sup> comparativement aux souris CD4C/HIV<sup>Nef</sup> (figures 8), ce qui est en accord avec la littérature (Marquis, Lewandowski et al. 2006). Nous avons également démontré que les souris Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>+/-</sup> présentent une charge buccale de *C. albicans* intermédiaire par rapport aux animaux homozygotes quant à l'absence du co-récepteur CD8 et aux souris Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup>. Il avait déjà été démontré que ces souris portent une charge buccale similaire à celle des CD4C/HIV<sup>Nef</sup> (Marquis, Lewandowski et al. 2006).

Lors d'une expérience de transfert adoptif, nous avons observé que l'injection de lymphocytes T CD8 naïfs provenant de souris non-Tg ne produisaient pas une diminution de la charge buccale de *C. albicans* chez les animaux Tg CD4C/HIV<sup>Nef</sup> CD8<sup>-/-</sup> infectés (figure 9). De même, le nombre de *C. albicans* retrouvées dans les organes des souris ayant reçu les lymphocytes ne se sont pas avérés être diminués par rapport aux témoins ayant reçu des injections de PBS (tableau I). Ces résultats sont conséquents avec les observations faites par Farah et al, qui n'ont observé une

diminution significative de la charge buccale que lors d'une seule journée suite à une reconstitution avec des lymphocytes T CD8 naïfs chez des souris BALB/c nu/nu subséquemment infectées au *Candida* oralement (Farah, Elahi et al. 2002).

Ainsi, la présence de lymphocytes T CD4 fonctionnels s'avère nécessaire afin de limiter la prolifération du champignon à la muqueuse buccale. Même si les lymphocytes T CD8 ont la capacité d'inhiber la croissance d'hyphes de *C. albicans* in vitro, leur absence dans les couches superficielles de la muqueuse buccale suggère que leur rôle ne serait pas l'inactivation du champignon par contact direct (Reichart, Philipsen et al. 1995). L'action exacte exercée par les lymphocytes T CD8 dans le contexte de la COP demeure méconnue mais la présence de cytokines leur étant propre dans la muqueuse (Lilly, Hart et al. 2004) suggère qu'ils puissent agir en activant les phagocytes, tel que proposé précédemment (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004).

Sachant l'importance du rôle joué par les lymphocytes T CD4 dans la défense contre *Candida* dans le cadre de la candidose oropharyngée, il est intéressant de varier les types cellulaires exprimant le transgène dans notre modèle. La souris Tg mCD4C/HIV<sup>Nef</sup> exprime elle aussi le gène nef, mais cette fois sous le contrôle du promoteur murin CD4. La production de la protéine est alors restreinte aux lymphocytes T CD4. Cette lignée de souris ne permet pas d'observer l'apparition de la maladie semblable au SIDA, malgré une diminution de nombre des lymphocytes T CD4 (Hu et al, manuscrit en préparation). L'infection buccale de ces souris à *C. albicans* a induit l'état de porteur chronique de la levure, et ce jusqu'à la fin de l'expérimentation (figure 10). Au moment du sacrifice, aucun animal du groupe expérimental ne présentait du *Candida* au niveau des organes profonds. Par ailleurs, tous démontraient une colonisation intestinale et stomacale.

Ces résultats démontrent que seule l'atteinte des lymphocytes T CD4 est suffisante pour engendrer une chronicité d'infection de *C. albicans* au niveau buccal dans notre modèle d'animaux transgéniques. Cette observation est cohérente avec les

travaux de Lewandowski et al (Lewandowski, Marquis et al. 2006) qui démontrent le rôle de premier plan joué par ces lymphocytes. Ceci ne signifie toutefois pas que les cellules dendritiques, les macrophages et/ou les PMNs ne soient pas impliqués afin de restreindre la dissémination de la levure à la muqueuse buccale.

La souris Tg CD4F/HIV<sup>Nef</sup> provient d'une lignée chez laquelle l'expression du transgène est régulée par le promoteur humain tronqué (Hanna, Rebai et al. 2001). Chez cet animal, la production de la protéine Nef est limitée aux lymphocytes T CD4 ainsi qu'à certaines cellules dendritiques de lignée lymphoïde (Hanna, Rebai et al. 2001). Semblables à la lignée mCD4C/HIV<sup>Nef</sup> quant aux types cellulaires exprimant le transgène, nous nous attendions à ce que les souris Tg CD4F/HIV<sup>Nef</sup> demeurent porteuses chroniques de *C. albicans* au niveau buccal suite à l'infection expérimentale. Les résultats présentés à la figure 11 démontrent que les animaux sont effectivement demeurés chroniquement colonisés au niveau buccal par *C. albicans*, alternant les récurrences et les période de rémission pendant lesquelles la levure n'était pas détectable. Il est possible que les absences ponctuelles complètes de *C. albicans*, phénomène qui n'a pas été observé chez les autres lignées du modèle, aient été causées par un niveau d'expression de transgène transcrit peu élevé chez le mâle transgénique ayant engendré les souris utilisées. Effectivement, l'expression du génome tronqué du VIH-1 chez les animaux transgéniques peut être mesurée, la quantité d'ARN produite corrélant directement avec l'ampleur de la maladie (Hanna, Kay et al. 1998). Par ailleurs, comme le groupe témoin a présenté des récurrences importantes de *C. albicans* en cours d'expérience, il est possible que le génotypage des animaux sous protocole ait été erroné. La validité des résultats concernant les souris Tg CD4F/HIV<sup>Nef</sup> ne peut donc être certifiée.

Dans le contexte de la candidose oropharyngée, tel que mentionné dans l'introduction, les PMNs sont des joueurs très important dans le combat face à *Candida* puisque ce sont les premières cellules effectrices recrutées dans la muqueuse buccale lors d'une infection (Goldsby, 2000). Ils agissent directement via la relâche de myéloperoxydase, de lactoferrine et par phagocytose, ainsi qu'indirectement en



sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (Schaller, Boeld et al. 2004). Chez l'Homme infecté au VIH-1, l'activité enzymatique, la phagocytose et la fongicidie des PMNs ont parfois été démontrées comme étant diminuées, augmentées ou inchangées, selon les cohortes et méthodes expérimentales utilisées (Marquis, Lewandowski et al. 2006). Des études précédentes ont permis d'observer chez notre modèle Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> infecté au niveau buccal par *C. albicans* une augmentation de la flambée oxidative par rapport au témoin non-Tg non infecté (Marquis, Lewandowski et al. 2006).

Tel que présenté à la figure 12, nous avons observé que la phagocytose de *C. albicans* par les PMNs est similaire chez les groupes Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-Tg, infectés ou non à *C. albicans* depuis 7 jours. Ces animaux sont âgés d'approximativement 7 semaines et les groupes infectés se retrouvent en phase de primo-infection. Chez des groupes âgés de 4 mois et dont les individus infectés à *Candida* sont porteurs de *C. albicans* depuis 70 jours, on remarque une diminution de la capacité phagocytaire des PMNs. Cette diminution est observable chez les groupes Tg, infectés ou non à *C. albicans*, à un ratio effecteur : cible de 2 :1. Cette observation est cependant significativement inversée à un ratio de 1 :5. Il semble donc que chez les animaux âgés chez qui les manifestations de la maladie sont accentuées, la quantité de levures influence la capacité phagocytaire des PMNs.

Les études d'activité fongicide des PMNs à l'égard de *Candida* ont démontré que 7 jours après infection buccale, la capacité à tuer la levure est diminuée chez les PMNs de souris Tg, infectés ou non, par rapport aux groupes non-Tg (figure 13). Cette altération fonctionnelle disparaît toutefois chez les animaux après 70 jours d'infection buccale. Finalement, des études effectuées dans le laboratoire ont démontré que la déplétion des PMNs à l'aide d'un anticorps monoclonal ne permet pas d'observer une hausse de la charge buccale de *C. albicans*, ni d'invasion du champignon aux organes profonds. Pris ensemble, ces résultats suggèrent que, puisque les PMNs n'expriment pas le transgène, des facteurs extrinsèques sont responsables de modifications au niveau des fonctions des PMNs vis-à-vis de *C.*

*albicans*. Par exemple, les cytokines comme l'IFN- $\gamma$  ou l'IL-12, secrétées entre autres par les cellules de Langerhans, peuvent exercer un impact sur le niveau d'activation des PMNs.

L'étude fonctionnelle des macrophages de souris CD4C/HIV<sup>MutA</sup> dans le contexte de la candidose oropharyngée serait optimale si l'on pouvait recueillir un grand nombre de ces cellules provenant de la muqueuse buccale directement. En effet, tel que mentionné dans l'introduction, les macrophages ne forment pas une population homogène mais bien plusieurs sous-populations exprimant des molécules de surface spécifiques et ayant des fonctions bien définies (Gordon and Taylor 2005). Par ailleurs, les technologies actuelles ne permettent pas l'étude exhaustive des macrophages de la muqueuse buccale, puisque leur utilisation nécessite tout d'abord le prélèvement puis la digestion des muqueuses des animaux, suivis d'un tri cellulaire afin d'enrichir la population. De plus, le nombre d'animaux nécessaires à la récolte d'un nombre adéquat de cellules pour chacun des groupes expérimentaux est irréaliste. C'est pourquoi, sachant que les macrophages péritonéaux expriment la protéine Nef chez nos souris Tg et que ceux-ci sont facilement accessibles en nombre important, nous avons choisi de prélever et d'étudier cette sous-population. Par ailleurs, comme les macrophages péritonéaux n'entrent théoriquement pas en contact direct avec *C. albicans* colonisant la cavité buccale, nous avons comparé les fonctions des cellules de groupes de souris non-infectés Tg et non-Tg.

Alors que les lymphocytes T CD4 sont diminués graduellement chez l'homme infecté au VIH-1, les macrophages sont quant à eux utilisés par le virus en tant que réservoir et on sait maintenant que la protéine Nef agit afin de contrer leur apoptose (Olivetta and Federico 2006). Il importait donc de vérifier si l'insertion du transgène chez nos souris avait un impact au niveau de la proportion de macrophages péritonéaux recrutés récoltés. Les résultats présentés au tableau IV démontrent que les différents types cellulaires présents dans la cavité péritonéale de souris ayant reçu une injection de thioglycolate de sodium sont représentés dans les mêmes proportions chez les souris Tg et non-Tg, de 2 ou 4 mois. Cette vérification était

nécessaire à titre de contrôle puisqu'au cours des expérimentations, aucun enrichissement des macrophages n'a été effectué.

Les résultats présentés à la figure 14 démontrent qu'à tout âge, tout ratio et pour tout temps testé, l'activité phagocytaire des macrophages péritonéaux provenant de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> est significativement supérieure à celles des témoins non-Tg. Comme cette suractivation des macrophages est observée pour toutes les conditions testées, elle ne peut être considérée comme un artéfact. De nombreux travaux portant sur l'activité phagocytaire des macrophages humains provenant de patients infectés au VIH-1 ont été menés jusqu'à présent. Les conclusions varient énormément d'un groupe à l'autre. Biggs et al ont montré que la phagocytose de *Toxoplasma* par des macrophages dérivés de monocytes circulants (MDM) était diminuée chez les individus infectés au VIH-1 (Biggs, Hewish et al. 1995). À l'opposé, Nottet et al ont observé que les MDM d'hommes positifs pour le VIH-1 avaient une activité phagocytaire normale face à *E. coli* et *S. aureus*. Il semble que l'altération de la phagocytose des pathogènes par les macrophages de patients VIH-1 puisse être attribuable à la diminution d'expression du récepteur FcγR à la surface des cellules (Kedzierska et al, 2002). Comme ce récepteur reconnaît le pathogène opsonisé par des anticorps IgG, cela pourrait expliquer pourquoi la phagocytose n'est pas diminuée dans nos expériences, puisque le *C. albicans* utilisé est non-opsonisé. En effet, on croit que le champignon est plutôt reconnu par des PRRs des macrophages, tels le récepteur du mannose, ainsi que les TLRs. Quoiqu'il en soit, il semble que les macrophages recrutés au thioglycolate de sodium et provenant de souris Tg se présentent dans un état pré-activés, comparativement aux souris non-Tg. L'activation de la voie de signalisation du NFκB par la protéine Nef pourrait potentiellement en être responsable, puisque la cascade enzymatique impliquée est déjà connue pour jouer un rôle dans la production de cytokines pro-inflammatoires (Olivetta, Percario et al. 2003). Il est intéressant de remarquer que, pour les souris Tg et non-Tg, l'activité phagocytaire est dépendante de l'âge, les macrophages provenant d'animaux plus vieux présentant une capacité de phagocytose accrue. Ceci est en accord avec les observations de Tasat *et al* qui ont démontré que les macrophages

alvéolaires traités au LPS et provenant de rats âgés montrent une activité phagocytaire plus grande que ceux provenant d'animaux jeunes (Tasat et al, 2003).

La capacité des PECs de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> à tuer le *C. albicans* intracellulaire a aussi été évaluée, et les résultats présentés à la figure 15 démontrent que, chez les souris de 4 mois et après 30 minutes de contact, l'activité fongicide des PECs est significativement augmentée. À tout autre temps ou âge, aucune différence n'est observée entre les groupes. Malgré la différence statistiquement significative, il est probable que ce résultat ne soit pas biologiquement significatif, puisque que pour toutes les autres conditions l'activité fongicide des deux groupes est similaire. Sachant que les PECs de souris Tg phagocytent dans une plus grande proportion que ceux de souris non-Tg, le fait que le pourcentage de *C. albicans* tué après un temps donné soit similaire pour chacun des groupes suggère que la capacité à inactiver le champignon soit déficiente chez les animaux Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup>. Cette atténuation de la fongicidie observée est en accord avec les résultats obtenus par d'autres groupes (Crowe 1995) (Baldwin, Fleischmann et al. 1990). Une production altérée de réactifs intermédiaires de l'oxygène et de l'azote pourrait expliquer la déficience en activité fongicide des macrophages péritonéaux exprimant Nef.

Des expériences d'évaluation de la production de peroxyde d'hydrogène par les macrophages péritonéaux de souris Tg et non-Tg ont démontré que seules, en présence d'inhibiteur ou de PMA, les cellules des groupes de souris âgées de 2 et 4 mois produisent des quantités similaires de peroxyde d'hydrogène extracellulaire (figure 16). Par ailleurs, en présence de *C. albicans* viable, les macrophages de souris Tg produisent plus de peroxyde d'hydrogène extracellulaire que animaux non-Tg lorsque les groupes sont plus jeunes. L'inverse est observé lorsque les groupes sont constitués d'animaux âgés de 4 mois. Il est cependant difficile d'interpréter la signification biologique de ces résultats puisque les variations intra-groupe sont particulièrement grandes. Il a été démontré que la production d'anions superoxyde par les macrophages de patients infectés au VIH-1 était modulée par Nef, ce qui entraînait des variations de sécrétion des espèces réactives de l'oxygène dans le temps

(Olivetta et al, 2005). Presque partout, la production de réactifs intermédiaires de l'oxygène est augmentée chez les animaux de 4 mois par rapport aux souris plus jeunes, de façon indépendante à la présence du transgène. Ce résultat est conséquent avec les observations de Tasat *et al* chez les macrophages alvéolaires de rats (Tasat et al, 2003). Mis en commun, les résultats obtenus ne peuvent permettre d'attribuer la diminution de fongicidie à une altération de production de peroxyde d'hydrogène.

Les résultats présentés à la figure 17 démontrent qu'en présence d'IFN- $\gamma$  ou de *C. albicans* inactivé, les macrophages péritonéaux de groupes Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> produisent statistiquement moins de monoxyde d'azote extracellulaire que les groupes non-Tg, chez les souris de 2 mois. Chez les souris plus âgées, une altération significative de la production de ce RNI est aussi observée chez les souris Tg lorsque les macrophages en présence d'IFN- $\gamma$ . Les macrophages de souris âgées exposées à *C. albicans* inactivé produisent des quantités normales de monoxyde d'azote, lorsque comparés à des cellules de souris non-Tg. Il est important de noter que si dans cette expérience les macrophages sont en contact avec du *Candida* préalablement tué, il en était tout autrement lors des expériences de fongicidie. Lors de prochaines expérimentations, il serait intéressant de vérifier l'impact de l'inactivation de *C. albicans* sur la production de monoxyde d'azote par les macrophages de souris Tg. La diminution de production de RNI pour presque toutes les conditions testées permet d'émettre l'hypothèse que cette altération participe à causer un déficit dans la capacité des macrophages péritonéaux provenant de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> à éliminer efficacement le champignon.

L'un des moyens les plus efficaces de démontrer l'effet d'une population cellulaire est de l'éliminer *in vivo*. Pour ce faire, l'utilisation de liposomes de clodronate s'avère souvent indiquée dans le cas des macrophages (Qualls, Kaplan et al. 2006) (Boonman, Schurmans et al. 2006). Le clodronate est libéré à l'intérieur du macrophage ayant phagocyté le liposome, ce qui induit l'apoptose lorsque la concentration du produit devient trop importante (Van Rooijen and Sanders 1994). Les liposomes de clodronate sont connus pour éliminer efficacement les macrophages

présents dans la rate, le foie, les poumons, la cavité péritonéale, les ganglions lymphatiques ainsi que les testicules. Malheureusement, les tests préliminaires (résultats non présentés) effectués au laboratoire ont démontré que les liposomes, injectés par la voie intra-veineuse et sous-cutanée dans l'intérieur de la joue, n'atteignent pas les macrophages présents dans la muqueuse buccale.

Plusieurs groupes utilisent la  $\lambda$ -carraghénane afin d'induire la déplétion des macrophages chez la souris (Jensen, Warner et al. 1993) (Farah, Elahi et al. 2001). L'injection de cette drogue provoque cependant de nombreux effets indésirables et souvent mal caractérisés. Elle peut par ailleurs être utilisée afin de créer une inflammation localisée au niveau des muscles, des articulations et des poumons (Sluka, Skyba et al. 2006) (Cuzzocrea, Nocentini et al. 2006). L'utilisation de ce produit aux doses conseillées dans la littérature a tout de même été expérimentée. Les résultats obtenus sont présentés au tableau V. Une discussion avec le vétérinaire traitant de l'animalerie a permis de conclure que chez la souris non-Tg C3H, l'injection de carraghénane provoquait une inflammation de la cavité péritonéale menant à l'iléus. Il s'agit d'une affection qui semble particulière à cette lignée puisque les souris contrôles BALB/c n'ont pas déperé suite à l'injection du produit. L'effet de la déplétion des macrophages dans la muqueuse buccale n'a donc pu être évaluée jusqu'à présent. La création de souris Tg déficientes en macrophages serait l'alternative idéale d'étudier l'importance de cette population cellulaire dans le cadre de la candidose oropharyngée.

En conclusion, il est évident que la déplétion graduelle et la perte de fonction des lymphocytes T CD4 chez nos souris Tg est au centre des perturbations permettant la colonisation chronique de la cavité buccale et du système gastro-intestinal par *C. albicans*. Par ailleurs, il a été démontré que les cellules dendritiques étaient impliquées dans la défense de l'hôte face à la levure et que les altérations de fonctions entraînées par Nef participent à l'établissement d'un état de porteur chronique chez le modèle. Par ailleurs, les fonctions des PMNs ne semblent que peu modifiées, possiblement sous l'action des cytokines et cellules effectrices présentes

dans la muqueuse. Finalement, nous avons pu établir que la présence du transgène exerce un impact quantitatif sur l'activité fonctionnelle des macrophages péritonéaux, et ce de différentes façons. La phagocytose de *C. albicans* par les macrophages péritonéaux est augmentée chez nos souris Tg, alors que celles-ci démontrent une plus faible activité fongicide, probablement due, du moins en partie, à une déficience de la production de monoxyde d'azote par les macrophages. Mis en commun, ces résultats reflètent les observations précédemment faites par d'autres groupes chez les macrophages provenant d'Hommes infectés au VIH-1, validant ainsi la représentativité de notre modèle. Idéalement, sachant que les macrophages péritonéaux semblent altérés par la présence de Nef, des études au niveau du nombre et de la fonction des macrophages présents directement dans la muqueuse buccale des animaux devraient être effectuées.

## Bibliographie

### Livres de référence :

- Calderone, R. A. (2002). Candida and candidiasis. Washington, D.C., ASM Press.
- Goldsby, R. A., T. J. Kindt, et al. (2000). Kuby immunology. New York, W.H. Freeman.
- Janeway, C. and P. Travers (2003). Immunobiology : the immune system in health and disease. London ; San Francisco; New York, Current Biology ; Garland Pub.
- Nanci, A. and A. R. Ten Cate (2003). Ten Cate's oral histology : development, structure, and function. St. Louis, Mosby.
- Paul, W. E. (2003). Fundamental immunology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

### Articles scientifiques :

- Abe, S., Okutomi, T., Tansho, S., Ishibashi, H., Wakabayashi, H., Teraguchi, S., Hayasawa, H. & Yamaguchi, H. (2000). Augmentation by lactoferrin of host defense against *Candida* infection in mice. In *Lactoferrin: Structure, Function and Applications*, pp. 195–201. Edited by K. Shimazaki, H. Tsuda, M. Tomita, T. Kuwata & J.-P. Perraudin. Amsterdam: Elsevier.
- Adurogbanga, M. I., G. A. Aderinokun, et al. (2004). "Oro-facial lesions and CD4 counts associated with HIV/AIDS in an adult population in Oyo State, Nigeria." Oral Dis **10**(6): 319-26.
- Ahmad, M., M. Piludu, et al. (2004). "Immunocytochemical localization of histatins in human salivary glands." J Histochem Cytochem **52**(3): 361-70.
- Ali, A., S. Niissalo, et al. (2005). "Expression of alpha-defensin-1 in chronic hyperplastic candidosis." J Oral Pathol Med **34**(6): 347-51.
- Anil, S. and L. P. Samaranayake (2002). "Impact of lysozyme and lactoferrin on oral *Candida* isolates exposed to polyene antimycotics and fluconazole." Oral Dis **8**(4): 199-206.
- Arai, R., T. Sugita, et al. (2004). "The anthracycline antitumor agents doxorubicin and daunorubicin reduce the activity of *Candida albicans* phospholipase B." Microbiol Immunol **48**(9): 665-7.
- Arendorf, T. M. and D. M. Walker (1980). "The prevalence and intra-oral distribution of *Candida albicans* in man." Arch Oral Biol **25**(1): 1-10.
- Arribas, J. R., S. Hernandez-Albujar, et al. (2000). "Impact of protease inhibitor therapy on HIV-related oropharyngeal candidiasis." Aids **14**(8): 979-85.
- Ashman, R. B., C. S. Farah, et al. (2004). "Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection." Immunol Cell Biol **82**(2): 196-204.
- Ashman, R. B. and J. M. Papadimitriou (1995). "Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection." Microbiol Rev **59**(4): 646-72.



- Baldwin, G. C., J. Fleischmann, et al. (1990). "Human immunodeficiency virus causes mononuclear phagocyte dysfunction." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(10): 3933-7.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." Annu Rev Immunol **18**: 767-811.
- Bennett, R. J. and A. D. Johnson (2005). "Mating in *Candida albicans* and the search for a sexual cycle." Annu Rev Microbiol **59**: 233-55.
- Beno, D. W., A. G. Stover, et al. (1995). "Growth inhibition of *Candida albicans* hyphae by CD8+ lymphocytes." J Immunol **154**(10): 5273-81.
- Berger, C. L., J. G. Vasquez, et al. (2006). "Langerhans cells: Mediators of immunity and tolerance." Int J Biochem Cell Biol.
- Biggs, B. A., M. Hewish, et al. (1995). "HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii*." J Immunol **154**(11): 6132-9.
- Boonman, Z. F., L. R. Schurmans, et al. (2006). "Macrophages are vital in spontaneous intraocular tumor eradication." Invest Ophthalmol Vis Sci **47**(7): 2959-65.
- Borg-von Zepelin, M., I. Meyer, et al. (1999). "HIV-Protease inhibitors reduce cell adherence of *Candida albicans* strains by inhibition of yeast secreted aspartic proteases." J Invest Dermatol **113**(5): 747-51.
- Bosch, J. A., M. Turkenburg, et al. (2003). "Stress as a determinant of saliva-mediated adherence and coadherence of oral and nonoral microorganisms." Psychosom Med **65**(4): 604-12.
- Bruch-Gerharz, D., K. Fehsel, et al. (1996). "A proinflammatory activity of interleukin 8 in human skin: expression of the inducible nitric oxide synthase in psoriatic lesions and cultured keratinocytes." J Exp Med **184**(5): 2007-12.
- Brysk, M. M., T. Bell, et al. (1991). "Interferon-gamma modulates terminal differentiation and the expression of desquamin in cultured keratinocytes." Exp Cell Res **197**(2): 140-7.
- Brysk, M. M., T. Bell, et al. (1991). "Sensitivity of desquamin to proteolytic degradation." Pathobiology **59**(2): 109-12.
- Challacombe, S. J. and J. R. Naglik (2006). "The Effects of HIV Infection on Oral Mucosal Immunity." Adv Dent Res **19**(1): 29-35.
- Challacombe, S. J. and S. P. Sweet (2002). "Oral mucosal immunity and HIV infection: current status." Oral Dis **8 Suppl 2**: 55-62.
- Chattopadhyay, A., L. R. Gray, et al. (2004). "Salivary secretory leukocyte protease inhibitor and oral candidiasis in human immunodeficiency virus type 1-infected persons." Infect Immun **72**(4): 1956-63.
- Chiang, C. P., H. Y. Wu, et al. (2002). "Quantitative analysis of immunocompetent cells in oral submucous fibrosis in Taiwan." Oral Oncol **38**(1): 56-63.
- Chou, L. L., J. Epstein, et al. (2000). "Oral mucosal Langerhans' cells as target, effector and vector in HIV infection." J Oral Pathol Med **29**(8): 394-402.
- Crowe, S. M. (1995). "Role of macrophages in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection." Aust N Z J Med **25**(6): 777-83.
- Crowe, S. M., N. J. Vardaxis, et al. (1994). "HIV infection of monocyte-derived macrophages in vitro reduces phagocytosis of *Candida albicans*." J Leukoc Biol **56**(3): 318-27.
- Curran, J. W., H. W. Jaffe, et al. (1988). "Epidemiology of HIV infection and AIDS in the United States." Science **239**(4840): 610-6.

- Cuzzocrea, S., G. Nocentini, et al. (2006). "Proinflammatory role of glucocorticoid-induced TNF receptor-related gene in acute lung inflammation." J Immunol **177**(1): 631-41.
- de Repentigny, L. (2004). "Animal models in the analysis of Candida host-pathogen interactions." Curr Opin Microbiol **7**(4): 324-9.
- de Repentigny, L., F. Aumont, et al. (2002). "Mucosal candidiasis in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1." J Infect Dis **185**(8): 1103-14.
- de Repentigny, L., D. Lewandowski, et al. (2004). "Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection." Clin Microbiol Rev **17**(4): 729-59, table of contents.
- De Smet, K. and R. Contreras (2005). "Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins." Biotechnol Lett **27**(18): 1337-47.
- Deslauriers, N., L. Cote, et al. (1997). "Oral carriage of Candida albicans in murine AIDS." Infect Immun **65**(2): 661-7.
- Diamond, R. D., R. A. Clark, et al. (1980). "Damage to Candida albicans hyphae and pseudohyphae by the myeloperoxidase system and oxidative products of neutrophil metabolism in vitro." J Clin Invest **66**(5): 908-17.
- Dodd, C. L., D. Greenspan, et al. (1991). "Oral candidiasis in HIV infection: pseudomembranous and erythematous candidiasis show similar rates of progression to AIDS." Aids **5**(11): 1339-43.
- Dongari-Bagtzoglou, A. and P. L. Fidel, Jr. (2005). "The host cytokine responses and protective immunity in oropharyngeal candidiasis." J Dent Res **84**(11): 966-77.
- Doumas, S., A. Kolokotronis, et al. (2005). "Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor." Infect Immun **73**(3): 1271-4.
- Epstein, J. B., L. H. Kimura, et al. (1982). "Effects of specific antibodies on the interaction between the fungus Candida albicans and human oral mucosa." Arch Oral Biol **27**(6): 469-74.
- Fallon, K., K. Bausch, et al. (1997). "Role of aspartic proteases in disseminated Candida albicans infection in mice." Infect Immun **65**(2): 551-6.
- Farah, C. S. and R. B. Ashman (2005). "Active and passive immunization against oral Candida albicans infection in a murine model." Oral Microbiol Immunol **20**(6): 376-81.
- Farah, C. S., S. Elahi, et al. (2002). "Primary role for CD4(+) T lymphocytes in recovery from oropharyngeal candidiasis." Infect Immun **70**(2): 724-31.
- Farah, C. S., S. Elahi, et al. (2001). "T cells augment monocyte and neutrophil function in host resistance against oropharyngeal candidiasis." Infect Immun **69**(10): 6110-8.
- Feigal, D. W., M. H. Katz, et al. (1991). "The prevalence of oral lesions in HIV-infected homosexual and bisexual men: three San Francisco epidemiological cohorts." Aids **5**(5): 519-25.
- Fidel, P. L., Jr. (2002). "Distinct protective host defenses against oral and vaginal candidiasis." Med Mycol **40**(4): 359-75.
- Frohm, M., B. Agerberth, et al. (1997). "The expression of the gene coding for the antibacterial peptide LL-37 is induced in human keratinocytes during inflammatory disorders." J Biol Chem **272**(24): 15258-63.
- Fujisawa, H., S. Kondo, et al. (1997). "The expression and modulation of IFN-alpha and IFN-beta in human keratinocytes." J Interferon Cytokine Res **17**(12): 721-5.

- Galask, R. P. (1988). "Vaginal colonization by bacteria and yeast." Am J Obstet Gynecol **158**(4): 993-5.
- Ganz, T., V. Gabayan, et al. (2003). "Increased inflammation in lysozyme M-deficient mice in response to *Micrococcus luteus* and its peptidoglycan." Blood **101**(6): 2388-92.
- Gorbach, S. L., L. Nahas, et al. (1967). "Studies of intestinal microflora. I. Effects of diet, age, and periodic sampling on numbers of fecal microorganisms in man." Gastroenterology **53**(6): 845-55.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." Nat Rev Immunol **5**(12): 953-64.
- Greene, W. C. and B. M. Peterlin (2002). "Charting HIV's remarkable voyage through the cell: Basic science as a passport to future therapy." Nat Med **8**(7): 673-80.
- Greenspan, D. and J. S. Greenspan (1992). "Oral lesions of HIV infection: features and therapy." AIDS Clin Rev: 225-39.
- Grone, A. (2002). "Keratinocytes and cytokines." Vet Immunol Immunopathol **88**(1-2): 1-12.
- Hanna, Z., D. G. Kay, et al. (1998). "Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice." Cell **95**(2): 163-75.
- Hanna, Z., E. Priceputu, et al. (2006). "HIV-1 Nef mutations abrogating downregulation of CD4 affect other Nef functions and show reduced pathogenicity in transgenic mice." Virology **346**(1): 40-52.
- Hanna, Z., N. Rebai, et al. (2001). "Distinct regulatory elements are required for faithful expression of human CD4 in T cells, macrophages, and dendritic cells of transgenic mice." Blood **98**(7): 2275-8.
- Harder, J., J. Bartels, et al. (2001). "Isolation and characterization of human beta - defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic." J Biol Chem **276**(8): 5707-13.
- Harder, J. and J. M. Schroder (2005). "Antimicrobial peptides in human skin." Chem Immunol Allergy **86**: 22-41.
- Herbein, G., U. Mahlknecht, et al. (1998). "Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4." Nature **395**(6698): 189-94.
- Hoshino, N., N. Katayama, et al. (2005). "A novel role for Notch ligand Delta-1 as a regulator of human Langerhans cell development from blood monocytes." J Leukoc Biol **78**(4): 921-9.
- Hoyer, L. L. (2001). "The ALS gene family of *Candida albicans*." Trends Microbiol **9**(4): 176-80.
- Hoyer, L. L., S. Scherer, et al. (1995). "Candida albicans ALS1: domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin separated by a repeating motif." Mol Microbiol **15**(1): 39-54.
- Ibrahim, H. R., T. Matsuzaki, et al. (2001). "Genetic evidence that antibacterial activity of lysozyme is independent of its catalytic function." FEBS Lett **506**(1): 27-32.
- Ihalin, R., V. Loimaranta, et al. (2006). "Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva." Arch Biochem Biophys **445**(2): 261-8.

- Jarvis, W. R. (1995). "Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species." Clin Infect Dis **20**(6): 1526-30.
- Jensen, J., T. Warner, et al. (1993). "Resistance of SCID mice to *Candida albicans* administered intravenously or colonizing the gut: role of polymorphonuclear leukocytes and macrophages." J Infect Dis **167**(4): 912-9.
- Joly, S., C. Maze, et al. (2004). "Human beta-defensins 2 and 3 demonstrate strain-selective activity against oral microorganisms." J Clin Microbiol **42**(3): 1024-9.
- Jones-Carson, J., A. Vazquez-Torres, et al. (1995). "Gamma delta T cell-induced nitric oxide production enhances resistance to mucosal candidiasis." Nat Med **1**(6): 552-7.
- Kedzierska, K. and S. M. Crowe (2001). "Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications." Antivir Chem Chemother **12**(3): 133-50.
- Kedzierska, K., J. Mak, et al. (2000). "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 **181**(1): 390-4.
- Kim, H. S., E. H. Choi, et al. (2005). "Expression of genes encoding innate host defense molecules in normal human monocytes in response to *Candida albicans*." Infect Immun **73**(6): 3714-24.
- Kirkpatrick, C. H. (2001). "Chronic mucocutaneous candidiasis." Pediatr Infect Dis J **20**(2): 197-206.
- Kleinegger, C. L., D. C. Stoeckel, et al. (2001). "A comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **92**(1): 62-7.
- Knight, S. C., S. Patterson, et al. (1991). "Stimulatory and suppressive effects of infection of dendritic cells with HIV-1." Immunol Lett **30**(2): 213-8.
- Koch, S., K. Kohl, et al. (2006). "Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesion, chemotaxis, and migration." J Allergy Clin Immunol **117**(1): 163-8.
- Kojic, E. M. and R. O. Darouiche (2004). "Candida infections of medical devices." Clin Microbiol Rev **17**(2): 255-67.
- Kolegraff, K., P. Bostik, et al. (2006). "Characterization and role of lentivirus-associated host proteins." Exp Biol Med (Maywood) **231**(3): 252-63.
- Kolokotronis, A., V. Kioses, et al. (1994). "Immunologic status in patients infected with HIV with oral candidiasis and hairy leukoplakia." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **78**(1): 41-6.
- Kremery, V. and A. J. Barnes (2002). "Non-*albicans* *Candida* spp. causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance." J Hosp Infect **50**(4): 243-60.
- Kumamoto, C. A. and M. D. Vinces (2005). "Alternative *Candida albicans* lifestyles: growth on surfaces." Annu Rev Microbiol **59**: 113-33.
- Kumamoto, C. A. and M. D. Vinces (2005). "Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence." Cell Microbiol **7**(11): 1546-54.
- Kurzai, O., C. Schmitt, et al. (2005). "Polymorphism of *Candida albicans* is a major factor in the interaction with human dendritic cells." Int J Med Microbiol **295**(2): 121-7.

- Kvaal, C., S. A. Lachke, et al. (1999). "Misexpression of the opaque-phase-specific gene PEP1 (SAP1) in the white phase of *Candida albicans* confers increased virulence in a mouse model of cutaneous infection." *Infect Immun* **67**(12): 6652-62.
- Kwon, D. S., G. Gregorio, et al. (2002). "DC-SIGN-mediated internalization of HIV is required for trans-enhancement of T cell infection." *Immunity* **16**(1): 135-44.
- Kwong, P. D., R. Wyatt, et al. (1998). "Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody." *Nature* **393**(6686): 648-59.
- Lacasse, M., C. Fortier, et al. (1990). "Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects." *J Oral Pathol Med* **19**(3): 136-41.
- Lachke, S. A., S. R. Lockhart, et al. (2003). "Skin facilitates *Candida albicans* mating." *Infect Immun* **71**(9): 4970-6.
- Lai, L., N. Alaverdi, et al. (1998). "Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping." *J Immunol* **160**(8): 3861-8.
- Leblanc, D. M., M. M. Barousse, et al. (2006). "Role for Dendritic Cells in Immunoregulation during Experimental Vaginal Candidiasis." *Infect Immun* **74**(6): 3213-21.
- Leidich, S. D., A. S. Ibrahim, et al. (1998). "Cloning and disruption of caPLB1, a phospholipase B gene involved in the pathogenicity of *Candida albicans*." *J Biol Chem* **273**(40): 26078-86.
- Lenander-Lumikari, M. (1992). "Inhibition of *Candida albicans* by the Peroxidase/SCN-/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system." *Oral Microbiol Immunol* **7**(5): 315-20.
- Lewandowski, D., M. Marquis, et al. (2006). "Altered CD4+ T cell phenotype and function determine the susceptibility to mucosal candidiasis in transgenic mice expressing HIV-1." *J Immunol* **177**(1): 479-91.
- Li, X. S., M. S. Reddy, et al. (2003). "*Candida albicans* Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5." *J Biol Chem* **278**(31): 28553-61.
- Lilly, E. A., D. J. Hart, et al. (2004). "Tissue-associated cytokine expression in HIV-positive persons with oropharyngeal candidiasis." *J Infect Dis* **190**(3): 605-12.
- Liu, X., H. Liu, et al. (2006). "Association of asymptomatic oral candidal carriage, oral candidiasis and CD4 lymphocyte count in HIV-positive patients in China." *Oral Dis* **12**(1): 41-4.
- Liu, Y., H. J. Buhning, et al. (2002). "Signal regulatory protein (SIRPalpha), a cellular ligand for CD47, regulates neutrophil transmigration." *J Biol Chem* **277**(12): 10028-36.
- Lo, H. J., J. R. Kohler, et al. (1997). "Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent." *Cell* **90**(5): 939-49.
- Lopez-De-Blanc, S. A., N. Salati-De-Mugnolo, et al. (2002). "Antifungal topical therapy in oral chronic candidosis. A comparative study." *Med Oral* **7**(4): 260-70.
- Lopez, A. D., C. D. Mathers, et al. (2006). "Global and regional burden of disease and risk factors, 2001: systematic analysis of population health data." *Lancet* **367**(9524): 1747-57.
- Lulloff, S. J., B. L. Hahn, et al. (2004). "Fungal susceptibility to zinc deprivation." *J Lab Clin Med* **144**(4): 208-14.

- Lupetti, A., A. Paulusma-Annema, et al. (2000). "Candidacidal activities of human lactoferrin peptides derived from the N terminus." Antimicrob Agents Chemother **44**(12): 3257-63.
- Macatonia, S. E., R. Lau, et al. (1990). "Dendritic cell infection, depletion and dysfunction in HIV-infected individuals." Immunology **71**(1): 38-45.
- Maenza, J. R., W. G. Merz, et al. (1997). "Infection due to fluconazole-resistant *Candida* in patients with AIDS: prevalence and microbiology." Clin Infect Dis **24**(1): 28-34.
- Marquis, M., D. Lewandowski, et al. (2006). "CD8+ T cells but not polymorphonuclear leukocytes are required to limit chronic oral carriage of *Candida albicans* in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1." Infect Immun **74**(4): 2382-91.
- Mavor, A. L., S. Thewes, et al. (2005). "Systemic fungal infections caused by *Candida* species: epidemiology, infection process and virulence attributes." Curr Drug Targets **6**(8): 863-74.
- Mocroft, A., C. Oancea, et al. (2005). "Decline in esophageal candidiasis and use of antimycotics in European patients with HIV." Am J Gastroenterol **100**(7): 1446-54.
- Montagnoli, C., S. Bozza, et al. (2003). "A role for antibodies in the generation of memory antifungal immunity." Eur J Immunol **33**(5): 1193-204.
- Murciano, C., E. Villamon, et al. (2006). "Killed *Candida albicans* yeasts and hyphae inhibit gamma interferon release by murine natural killer cells." Infect Immun **74**(2): 1403-6.
- Murthy, A. R., R. I. Lehrer, et al. (1993). "In vitro candidastatic properties of the human neutrophil calprotectin complex." J Immunol **151**(11): 6291-301.
- Myers, T. A., J. E. Leigh, et al. (2003). "Immunohistochemical evaluation of T cells in oral lesions from human immunodeficiency virus-positive persons with oropharyngeal candidiasis." Infect Immun **71**(2): 956-63.
- Nielsen, H., K. D. Bentsen, et al. (1994). "Oral candidiasis and immune status of HIV-infected patients." J Oral Pathol Med **23**(3): 140-3.
- Niyonsaba, F. and H. Ogawa (2005). "Protective roles of the skin against infection: implication of naturally occurring human antimicrobial agents beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme." J Dermatol Sci **40**(3): 157-68.
- Nuijens, J. H., P. H. van Berkel, et al. (1996). "Structure and biological actions of lactoferrin." J Mammary Gland Biol Neoplasia **1**(3): 285-95.
- Olivetta, E. and M. Federico (2006). "HIV-1 Nef protects human-monocyte-derived macrophages from HIV-1-induced apoptosis." Exp Cell Res **312**(6): 890-900.
- Olivetta, E., Z. Percario, et al. (2003). "HIV-1 Nef induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappa B activation." J Immunol **170**(4): 1716-27.
- Olivetta, E., D. Pietraforte, et al. (2005). "HIV-1 Nef regulates the release of superoxide anions from human macrophages." Biochem J **390**(Pt 2): 591-602.
- Orenstein, J. M., C. Fox, et al. (1997). "Macrophages as a source of HIV during opportunistic infections." Science **276**(5320): 1857-61.

- Percario, Z., E. Olivetta, et al. (2003). "Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef activates STAT3 in primary human monocyte/macrophages through the release of soluble factors: involvement of Nef domains interacting with the cell endocytotic machinery." *J Leukoc Biol* **74**(5): 821-32.
- Pietrella, D., G. Bistoni, et al. (2006). "Candida albicans mannoprotein influences the biological function of dendritic cells." *Cell Microbiol* **8**(4): 602-12.
- Pivarcsi, A., L. Bodai, et al. (2003). "Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes." *Int Immunol* **15**(6): 721-30.
- Poudrier, J., X. Weng, et al. (2003). "The AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with accumulation of immature CD11bHi dendritic cells." *J Virol* **77**(21): 11733-44.
- Qualls, J. E., A. M. Kaplan, et al. (2006). "Suppression of experimental colitis by intestinal mononuclear phagocytes." *J Leukoc Biol*.
- Reichart, P. A. (2003). "Oral manifestations in HIV infection: fungal and bacterial infections, Kaposi's sarcoma." *Med Microbiol Immunol (Berl)* **192**(3): 165-9.
- Reichart, P. A., H. P. Philipsen, et al. (1995). "Pseudomembranous oral candidiasis in HIV infection: ultrastructural findings." *J Oral Pathol Med* **24**(6): 276-81.
- Robinson, P. G., S. J. Challacombe, et al. (1997). "Is erythematous candidiasis associated with advanced HIV disease?" *Oral Dis* **3** Suppl 1: S116-8.
- Rudel, T. and G. M. Bokoch (1997). "Membrane and morphological changes in apoptotic cells regulated by caspase-mediated activation of PAK2." *Science* **276**(5318): 1571-4.
- Samaranayake, L. P. and P. Holmstrup (1989). "Oral candidiasis and human immunodeficiency virus infection." *J Oral Pathol Med* **18**(10): 554-64.
- Schaller, M., U. Boeld, et al. (2004). "Polymorphonuclear leukocytes (PMNs) induce protective Th1-type cytokine epithelial responses in an in vitro model of oral candidosis." *Microbiology* **150**(Pt 9): 2807-13.
- Schaller, M., C. Borelli, et al. (2005). "Hydrolytic enzymes as virulence factors of Candida albicans." *Mycoses* **48**(6): 365-77.
- Schaller, M., H. C. Korting, et al. (2005). "Candida albicans-secreted aspartic proteinases modify the epithelial cytokine response in an in vitro model of vaginal candidiasis." *Infect Immun* **73**(5): 2758-65.
- Schaller, M., R. Mailhammer, et al. (2002). "Cytokine expression induced by Candida albicans in a model of cutaneous candidosis based on reconstituted human epidermis." *J Med Microbiol* **51**(8): 672-6.
- Sluka, K. A., D. A. Skyba, et al. (2006). "Joint mobilization reduces hyperalgesia associated with chronic muscle and joint inflammation in rats." *J Pain* **7**(8): 602-7.
- Sonneborn, A., D. P. Bockmuhl, et al. (1999). "Chlamydospore formation in Candida albicans requires the Efg1p morphogenetic regulator." *Infect Immun* **67**(10): 5514-7.
- Staab, J. F., Y. S. Bahn, et al. (2004). "Expression of transglutaminase substrate activity on Candida albicans germ tubes through a coiled, disulfide-bonded N-terminal domain of Hwp1 requires C-terminal glycosylphosphatidylinositol modification." *J Biol Chem* **279**(39): 40737-47.

- Stover, J., N. Walker, et al. (2006). "Projecting the demographic impact of AIDS and the number of people in need of treatment: updates to the Spectrum projection package." Sex Transm Infect **82 Suppl 3**: iii45-iii50.
- Sweet, S. P. (1997). "Selection and pathogenicity of *Candida albicans* in HIV infection." Oral Dis **3 Suppl 1**: S88-95.
- Szolnoky, G., Z. Bata-Csorgo, et al. (2001). "A mannose-binding receptor is expressed on human keratinocytes and mediates killing of *Candida albicans*." J Invest Dermatol **117(2)**: 205-13.
- Tachado, S. D., J. Zhang, et al. (2005). "HIV impairs TNF-alpha release in response to Toll-like receptor 4 stimulation in human macrophages in vitro." Am J Respir Cell Mol Biol **33(6)**: 610-21.
- Takakura, N., H. Wakabayashi, et al. (2004). "Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model." J Med Microbiol **53(Pt 6)**: 495-500.
- Tomee, J. F., P. S. Hiemstra, et al. (1997). "Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi." J Infect Dis **176(3)**: 740-7.
- Tosi, M. F., A. Hamedani, et al. (1994). "ICAM-1-independent, CD18-dependent adhesion between neutrophils and human airway epithelial cells exposed in vitro to ozone." J Immunol **152(4)**: 1935-42.
- Valladeau, J. and S. Saeland (2005). "Cutaneous dendritic cells." Semin Immunol **17(4)**: 273-83.
- van Loon, L. A., S. R. Krieg, et al. (1989). "Quantification and distribution of lymphocyte subsets and Langerhans cells in normal human oral mucosa and skin." J Oral Pathol Med **18(4)**: 197-201.
- Van Rooijen, N. and A. Sanders (1994). "Liposome mediated depletion of macrophages: mechanism of action, preparation of liposomes and applications." J Immunol Methods **174(1-2)**: 83-93.
- Vazquez-Torres, A. and E. Balish (1997). "Macrophages in resistance to candidiasis." Microbiol Mol Biol Rev **61(2)**: 170-92.
- Vazquez, N., T. Greenwell-Wild, et al. (2005). "Human immunodeficiency virus type 1-induced macrophage gene expression includes the p21 gene, a target for viral regulation." J Virol **79(7)**: 4479-91.
- Vincent, P., E. Priceputu, et al. (2006). "Activation of p21-activated kinase 2 and its association with Nef are conserved in murine cells but are not sufficient to induce an AIDS-like disease in CD4C/HIV transgenic mice." J Biol Chem **281(11)**: 6940-54.
- Vylkova, S., X. S. Li, et al. (2006). "Distinct antifungal mechanisms: beta-defensins require *Candida albicans* Ssa1 protein, while Trk1p mediates activity of cysteine-free cationic peptides." Antimicrob Agents Chemother **50(1)**: 324-31.
- Wagner, R. D., A. Vazquez-Torres, et al. (1996). "B cell knockout mice are resistant to mucosal and systemic candidiasis of endogenous origin but susceptible to experimental systemic candidiasis." J Infect Dis **174(3)**: 589-97.
- Wahl, S. M., J. B. Allen, et al. (1989). "HIV-1 and its envelope glycoprotein down-regulate chemotactic ligand receptors and chemotactic function of peripheral blood monocytes." J Immunol **142(10)**: 3553-9.



- Weinert, M., R. M. Grimes, et al. (1996). "Oral manifestations of HIV infection." Ann Intern Med **125**(6): 485-96.
- Whiteway, M. and U. Oberholzer (2004). "Candida morphogenesis and host-pathogen interactions." Curr Opin Microbiol **7**(4): 350-7.
- Wingens, M., B. H. van Bergen, et al. (1998). "Induction of SLPI (ALP/HUSI-I) in epidermal keratinocytes." J Invest Dermatol **111**(6): 996-1002.
- Wozniak, K. L., J. E. Leigh, et al. (2002). "A comprehensive study of Candida-specific antibodies in the saliva of human immunodeficiency virus-positive individuals with oropharyngeal candidiasis." J Infect Dis **185**(9): 1269-76.
- Wu, T., L. P. Samaranyake, et al. (1999). "Inhibition of growth and secreted aspartyl proteinase production in *Candida albicans* by lysozyme." J Med Microbiol **48**(8): 721-30.
- Yan, S., R. G. Rodrigues, et al. (1998). "Hemoglobin-induced binding of *Candida albicans* to the cell-binding domain of fibronectin is independent of the Arg-Gly-Asp sequence." Infect Immun **66**(5): 1904-9.
- Yang, Y. L. (2003). "Virulence factors of *Candida* species." J Microbiol Immunol Infect **36**(4): 223-8.
- Yang, Y. L., H. J. Lo, et al. (2006). "Effect of prolonged HAART on oral colonization with *Candida* and candidiasis." BMC Infect Dis **6**: 8.
- Yano, J., E. A. Lilly, et al. (2005). "Oral and vaginal epithelial cell anti-*Candida* activity is acid labile and does not require live epithelial cells." Oral Microbiol Immunol **20**(4): 199-205.
- Zancanaro, P. C., L. Y. McGirt, et al. (2006). "Cutaneous manifestations of HIV in the era of highly active antiretroviral therapy: an institutional urban clinic experience." J Am Acad Dermatol **54**(4): 581-8.

## Annexe I

### Milieux et Tampons

#### Milieu RPMI supplémenté

RPMI 1640 avec rouge de phénol	
Sérum de bovin fœtal	10%
Pénicilline/Streptomycine	100U/mL
Amphotéricine B	0.25µg/mL
Gentamicine	50µg/mL
L-glutamine	2mM
2-β-mercaptoéthanol	5x10 <sup>-5</sup> M
HEPES	20mM

#### Milieu RPMI modifié (utilisé lors des expériences de production de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

RPMI 1640 <b>sans</b> rouge de phénol	
Pénicilline/Streptomycine	100U/mL
Amphotéricine B	0.25µg/mL
Gentamicine	50µg/mL
L-glutamine	2mM
2-β-mercaptoéthanol	5x10 <sup>-5</sup> M
HEPES	20mM

#### Tampon PRS

Tampon potassium phosphate	10mM
NaCl	140mM
Dextrose	5.5mM
Rouge de phénol	0.56mM
Peroxydase de Raifort	19U/mL

#### Tampon nettoyant

Tris	20mM
NaCl	20mM
EDTA	40mM
DTT	1mM