

Université de Montréal

Rôle des macrophages contre *Candida albicans* chez la souris transgénique
exprimant le génome du VIH-1

par

Émilie Bélanger Trudelle

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

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

Septembre 2009

©Émilie Bélanger Trudelle, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

Rôle des macrophages contre *Candida albicans* chez la souris transgénique
exprimant le génome du VIH-1

présenté par :

Émilie Bélanger Trudelle

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Jean Barbeau

Président rapporteur

Louis de Repentigny

Directeur de recherche

Hugo Soudeyns

Membre du jury

RÉSUMÉ

La candidose oropharyngée (COP) constitue l'infection fongique opportuniste la plus fréquente chez les patients infectés au VIH-1. Malgré la profonde immunosuppression causée par le VIH-1, l'infection à *Candida albicans* demeure confinée au niveau de la muqueuse buccale sans dissémination aux organes profonds. La souris transgénique (Tg) CD4C/HIV^{Mut} exprimant le génome tronqué du VIH-1 présente, suite à l'inoculation orale de *C. albicans*, une COP chronique reproduisant fidèlement l'infection chez les patients séropositifs. Cette souris Tg a donc été utilisée afin de déterminer si les macrophages contribuent au confinement de *C. albicans* à la muqueuse buccale. Cette étude a permis de démontrer que i) les macrophages sont recrutés aux muqueuses buccale et gastrique en réponse au champignon malgré l'expression du transgène, ii) les macrophages de ces souris Tg présentent une polarisation vers un phénotype d'activation alternative et iii) la production de monoxyde d'azote par les macrophages des souris Tg n'est pas requise pour limiter la prolifération de *Candida* à la muqueuse buccale et pour restreindre sa dissémination aux organes profonds. Les macrophages ne semblent donc pas directement responsables de l'établissement de l'infection chronique à *Candida* chez la souris Tg CD4C/HIV^{Mut}.

MOTS CLÉS :

Candidose oropharyngée

Macrophages

VIH-1

Modèles murins

Lymphocytes T

SUMMARY

Oropharyngeal candidiasis (OPC) is the most frequent opportunistic fungal infection among HIV-infected patients. Despite the profound immunosuppression caused by HIV-1, *Candida albicans* infection is limited to the oral epithelium and rarely disseminates to deep organs. The CD4C/HIV^{Mut} transgenic (Tg) mice, which expresses the truncated HIV-1 genome, developed a chronic OPC after oral inoculation with *C. albicans* that closely reproduces infection in seropositive patients. Here, we used this Tg mouse to investigate the contribution of macrophages in limiting candidiasis to the oral mucosa. This study shows that i) macrophages are recruited to the oral and gastric mucosa in response to *C. albicans* despite transgene expression, ii) the macrophages of this Tg mouse exhibited a polarization toward an alternatively activated phenotype and iii) nitric oxide production by these macrophages is dispensable for limiting chronic oral carriage and for preventing systemic dissemination of the fungi in these Tg mice. Overall, these results indicate that macrophages do not directly determine the susceptibility to chronic carriage of *Candida* in these CD4C/HIV^{Mut} Tg mice.

KEY WORDS

Oropharyngeal candidiasis

Macrophages

HIV-1

Mouse model

T lymphocytes

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ ET MOTS CLÉS	i
SUMMARY AND KEY WORDS	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES TABLEAUX	v
LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES ABBRÉVIATIONS	ix
REMERCIEMENTS	xi
ANNEXE 1	xii

CHAPITRE 1: *Candida albicans* et candidose 1

1.1 Description et classification de <i>Candida</i>	1
1.2 Épidémiologie et principales manifestations cliniques	3
1.3 Pathogénèse des infections à <i>Candida</i>	4
1.3.1 Facteurs de virulence	4
1.3.1.1 Adhérence	4
1.3.1.2 Enzymes hydrolytiques	5
1.3.1.3 Polymorphisme	6
1.3.1.4 Transition phénotypique	7
1.3.2 Les systèmes de défenses immunitaires contre <i>C. albicans</i>	7
1.3.2.1 Mécanismes de défenses innées	7
1.3.2.2 Mécanismes de défenses cellulaires résidents de la muqueuse oropharyngée	11
1.3.2.2.1 Kératinocytes.....	11
1.3.2.2.2 Cellules de Langerhans.....	13
1.3.3 Mécanismes de défenses cellulaires recrutés à la muqueuse	14
1.3.3.1 Macrophages	14
1.3.3.2 Polymorphonucléaires.....	16
1.3.3.3 Cellules NK.....	17
1.3.3.4 Lymphocytes T	18
1.3.3.4.1 Lymphocytes T CD4+	18
1.3.3.4.2 Lymphocytes T CD8+	21
1.3.3.4.3 Lymphocytes T gamma/delta	21
1.3.3.5 Lymphocytes B	22

CHAPITRE 2: La candidose dans le contexte de l'infection au VIH 23

2.1 Histologie de la muqueuse buccale et digestive	23
2.1.1 La muqueuse buccale.....	23
2.1.2 La langue	24
2.1.3 L'estomac	25
2.2 Types de candidoses associés au VIH	26
2.3 Virus de l'immunodéficience acquise.....	30
2.3.1 Épidémiologie et transmission.....	30
2.3.2. Pathogénèse	31
2.3.3 Tropisme	32
2.3.4 Structure, gènes et fonctions.....	32
2.3.5 Perturbations des mécanismes de protection envers <i>C. albicans</i> induites par le VIH	34

2.3.5.1	Immunité humorale	34
2.3.5.2	Immunité à médiation cellulaire	35
2.3.5.2.1	Les kératinocytes	35
2.3.5.2.2	Les lymphocytes T	35
2.3.5.3	Cellules effectrices	36
2.3.5.3.1	Les cellules de Langerhans	36
2.3.5.3.2	Les polymorphonucléaires (PMNs)	37
2.3.5.3.3	Les macrophages	37
CHAPITRE 3: Modèles murins de la candidose		40
3.1	Souris et immunosuppresseurs	40
3.2	Souris atteintes d'immunodéficiences congénitales	41
3.3	Souris Knockout	42
3.4	Souris transgéniques exprimant le génome du VIH-1	43
3.4.1	CD4C/HIV ^{MutA}	43
3.4.1.1	Expression du transgène	43
3.4.1.2	Sévérité de la pathologie et phénotype de porteur chronique de <i>C. albicans</i>	45
3.4.2	CD4C/HIV ^{MutG}	45
3.4.3	CD4C/HIV ^{MutG} iNOS KO	46
RAISONNEMENT ET HYPOTHÈSE		47
MATÉRIEL ET MÉTHODES		48
RÉSULTATS		61
DISCUSSION		83
BIBLIOGRAPHIE		96

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Groupes expérimentaux (Tg infectés) utilisés pour des études pathologiques et d'immunohistochimie sur les tissus de souris Tg et non-Tg, infectées ou non.

Tableau II : Décomptes moyens des charges de *C. albicans* (CFU/g) retrouvés aux organes profonds de souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV^{MutG} iNOS infectées oralement.

Tableau III : Évaluation de la déplétion des macrophages provenant de la rate, du petit-intestin et de la muqueuse buccale chez des souris non-Tg non-infectées (7 souris par groupe) suite à l'injection dans la veine caudale de 200 µL de liposomes-clodronate, de liposome-PBS ou de PBS (Essai 1) et à l'injection intra-jugale et à l'application topique de 50 µL de ces mêmes produits (Essais 2 et 3).

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Cycle parasexué de *C. albicans*.

Figure 2 : Polarisation phénotypique des macrophages et expression des gènes, cytokines, chimiokines et récepteurs de surface associés.

Figure 3 : La candidose pseudomembranaire.

Figure 4 : La candidose érythémateuse.

Figure 5 : Le virus de l'immunodéficience humaine.

Figure 6 : Structure du transgène CD4C/HIV^{Mut}. L'*enhancer* CD4 murin, le promoteur CD4 humain, chacun des génomes mutés du VIH-1 et la séquence de polyadénylation du virus simien SV40 ont été liés.

Figure 7 : Charges buccales moyennes \pm écart type de *C. albicans* LAM-1 retrouvées chez des souris Tg CD4C/HIV^{MutA} infectées jusqu'à l'apparition des points limites (pré-mortem) (bleue) et chez des souris non-Tg infectées 70 jours (rose).

Figure 8 : Charges buccales de *C. albicans* LAM-1 retrouvées chez chacun des 6 sujets Tg CD4C/HIV^{MutA} infectés jusqu'à l'apparition des points limites.

Figure 9A : Coloration de la muqueuse gastrique de souris Tg CD4C/HIV^{MutA} infectées oralement à *C. albicans* LAM-1 durant 70 jours ou jusqu'à l'apparition des points limites (pré-mortem) et des différents groupes témoins. Les encadrés représentent la portion agrandie dans les insertions et les flèches identifient les polymorphonucléaires neutrophiles (HPS Tg infectées 70 jours et pré-mortem). Les images représentent au moins trois expérimentations ayant produit des résultats similaires.

Figure 9B : Immunohistochimie de la muqueuse gastrique de souris Tg CD4C/HIV^{MutA} infectées oralement à *C. albicans* LAM-1 durant 70 jours ou jusqu'à l'apparition des points limites (pré-mortem) et des différents groupes témoins. Les encadrés représentent la portion agrandie dans les insertions. Les images représentent au moins trois expérimentations ayant produit des résultats similaires.

Figure 9 C : Coloration de la muqueuse buccale de souris Tg CD4C/HIV^{MutA} infectées oralement à *C. albicans* LAM-1 durant 70 jours ou jusqu'à l'apparition des points limites (pré-mortem) et des différents groupes témoins. Les encadrés représentent la portion agrandie dans les insertions. Les images représentent au moins trois expérimentations ayant produit des résultats similaires.

Figure 9 D : Immunohistochimie de la muqueuse buccale de souris Tg CD4C/HIV^{MutA} infectées oralement à *C. albicans* LAM-1 durant 70 jours ou jusqu'à l'apparition des points limites (pré-mortem) et des différents groupes témoins. Les encadrés représentent la portion agrandie dans les insertions. Les images représentent au moins trois expérimentations ayant produit des résultats similaires.

Figure 10 : Immunofluorescence simple de macrophages péritonéaux provenant de souris non-Tg élicitées ou non au thioglycolate. Ces macrophages ont été mis en culture puis stimulés à l'IFN- γ ou à l'IL-4 afin d'induire la polarisation vers un phénotype d'activation classique (M1) ou alternative (M2), respectivement. Ces images représentent trois expérimentations ayant produit des résultats similaires.

Figure 11 Double immunofluorescence des muqueuses gastrique et buccale obtenues de souris CD4C/HIV^{MutA} pré-mortem infectées oralement à *C. albicans* LAM-1. La population macrophagique est identifiée à l'aide de l'anticorps anti-F4/80 murin et les macrophages d'activation classique (M1) ou alternative (M2) sont identifiés à l'aide des anticorps anti-MCP-1 et anti-CD206 murins, respectivement. Les images représentent au moins trois expérimentations ayant produit des résultats similaires.

Figure 12A : Charge buccale moyenne \pm écart type de *C. albicans* LAM-1 retrouvée chez des souris Tg CD4C/HIV^{MutG} *NOS2*^{-/-} (rouge), Tg CD4C/HIV^{MutG} *NOS2*^{+/-} (bleu) ainsi que chez leurs témoins non-Tg *NOS2*^{-/-} (vert) et *NOS2*^{+/-} (jaune) entre les jours 1 et 157 post-infection.

Figure 12 B : Taux de survie de souris Tg CD4C/HIV^{MutG} *NOS2*^{-/-} (rouge), CD4C/HIV^{MutG} *NOS2*^{+/-} (bleu) ainsi que leurs témoins non-Tg *NOS2*^{-/-} (vert) et *NOS2*^{+/-} (jaune) infectées oralement à *C. albicans* LAM-1 durant 157 jours (Tg *NOS2*^{+/-} ou *NOS2*^{-/-}), 156 jours (non-Tg *NOS2*^{-/-}) et 155 jours (non-Tg *NOS2*^{+/-}).

Figure 13 : Production d'oxyde nitrique (moyenne \pm écart type) par les macrophages péritonéaux de souris non-Tg *NOS2*^{+/+}, *NOS2*^{+/-} et *NOS2*^{-/-} (violet) exposés à l'IFN- γ durant 48 heures et par leurs témoins négatifs respectifs (lilas). *, $P < 0,05$ par rapport aux animaux *NOS2*^{+/+}.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ALS : *Agglutinin-like sequences*

APC : fluorochrome allophycocyanine

ATP : adénosine tri-phosphate

CD4C : modèle C du promoteur humain contrôlant l'expression du transgène composé d'une portion du génome du VIH-1 chez la souris Tg CD4C/HIV^{Mut}

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

COP : candidose oropharyngée

CCR : *Chemokine (C-C motif) receptor*

CCL : *Chemokine (C-C motif) ligand*

CXCL : *Chemokine (CXCL motif) ligand*

DC : cellule dendritique

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

FITC : fluorochrome *fluorescein isothiocyanate*

GM-CSF : facteurs de stimulation de colonies spécifiques de la lignée granulocyte-macrophage

HAART : *highly active anti-retroviral therapy*

Ig : immunoglobuline

IL : interleukine

IFN : interféron

iNOS : monoxyde d'azote synthase inductible

IP-10 : *IFN- γ inducible protein 10*

LC : cellules de Langerhans

LPS : lipopolysaccharide

LTR : *long terminal repeat*

M Φ : macrophages

MCP-1 : *monocyte chemoattractant protein-1*

MIP-1 : *macrophage inflammatory protein-1*

NK : natural killer

NO : monoxyde d'azote

NOS2 : *Nitric oxide synthase 2*

PAS: *Periodic Acid Schiff*

PAK2 : *p-21 activated kinase*

PCR : réaction en chaîne par polymérase

PE : fluorochrome phycoérythrine

PerCP : fluorochrome *peridinin chlorophyll-a protein*

PL : phospholipase

PMN : polymorphonucléaires neutrophiles

PRR : *Pattern Recognition Receptor*

RT-PCR : réaction en chaîne par polymérase en temps réel

Sap : *secreted aspartic proteinase*

SCID : *severe combined immunodeficiency*

SIDA : Syndrome d'immunodéficience acquise

TCR : récepteur de cellules T

TGF : *Transforming growth factor*

TLR : *Toll-like receptor*

TNF : *Tumor necrosis factor*

VIH-1 : virus de l'immunodéficience humaine

REMERCIEMENTS

Merci au Dr Louis de Repentigny, pour son accueil et son enseignement rigoureux;

Merci aux membres du laboratoire pour leurs conseils, leur aide, leur patience et leur sens de l'humour;

Merci à ma famille pour leurs encouragements, leur soutien et leur confiance inconditionnelle.

ANNEXE 1

Milieux et solutions

Solution de lyse des érythrocytes

H ₂ O	
NH ₄ Cl	155 mM
KHCO ₂	10 mM
EDTA 0.5M	0,1 mM

Milieu RPMI supplémenté (utilisé lors de l'immunofluorescence simple)

RPMI 1640 <u>avec</u> rouge de phénol	
Sérum de bovin fœtal	10%
Pénicilline/Streptomycine	100U/mL
Gentamicine	50 ug/mL
L-glutamine	2mM
HEPES 1M	20mM

Milieu RPMI supplémenté modifié (utilisé lors de la quantification du NO)

RPMI 1640 <u>sans</u> rouge de phénol	
Pénicilline/Streptomycine	1 %
Gentamicine	10 mg/mL
L-glutamine	1%
HEPES 1M	2%

Solution de lavage

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

INTRODUCTION

Chapitre 1 : *Candida albicans* et candidose

1.1 Description et classification de *Candida*

Candida est un champignon diploïde imparfait qui constitue la cause la plus commune de mycose opportuniste (Calderone 2002). Il s'agit d'un commensal de la peau et des membranes muqueuses du tractus gastro-intestinal et uro-génital retrouvé chez près de 62% de la population (Barnett 2008). Le genre *Candida* regroupe près de 150 espèces dont les plus fréquemment isolées chez l'homme sont *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. lusitaniae* et *C. krusei* (Borman, Petch et al. 2008). Malgré l'augmentation de la prévalence des infections nosocomiales causées par les espèces autres que *C. albicans*, cette dernière demeure l'agent étiologique principal de la candidose (Borman, Petch et al. 2008).

C. albicans est une levure polymorphe dont le génome comprend 6400 gènes distribués sur 8 chromosomes (Odds, Brown et al. 2004). Sa paroi cellulaire est composée de quatre polysaccharides majeurs : le mannane, le β -1,3-glucane, le β -1,6-glucane et la chitine (Nather and Munro 2008). *C. albicans* possède la capacité de se présenter sous quatre formes morphologiques différentes, soient : la levure, l'hyphe, la pseudohyphe et la chlamydospore (Whiteway and Oberholzer 2004). Alors que cette dernière forme est principalement observée *in vitro*, les autres sont fréquemment retrouvées aux sites de la candidose (Sonneborn, Bockmuhl et al. 1999). *C. albicans* a longtemps été considéré comme un champignon asexué. Cependant, une reproduction parasexuée (figure 1) entre cellules haploïdes *a* et α a été observée *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin suite à l'étude du *Mating Type-like Locus (MTL)* (Hull, Raisner et al. 2000; Magee and Magee 2000). Ce même locus est également impliqué dans la transition de la forme blanche à la forme opaque des colonies de *C. albicans in vitro*, autant chez les souches de laboratoire que cliniques (Lockhart, Pujol et al. 2002).

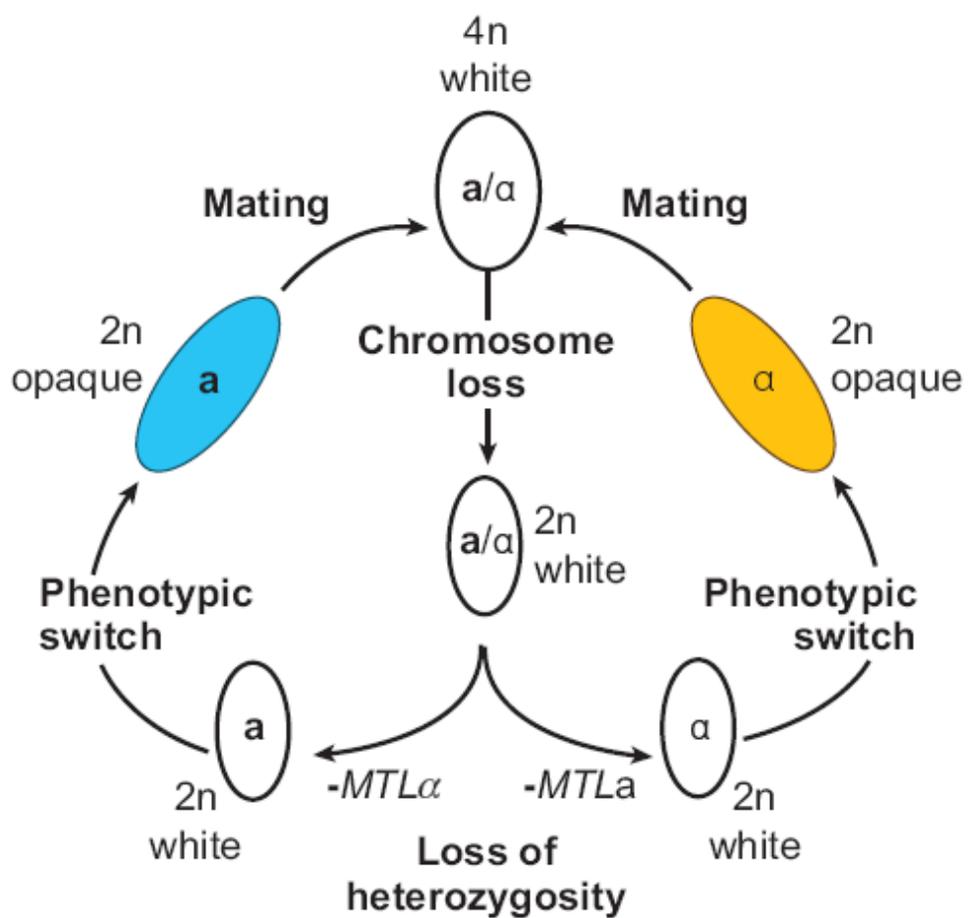


Figure 1 : Cycle parasexué de *C. albicans* (modifié de Noble & Johnson 2007).

1.2 Épidémiologie et principales manifestations cliniques

La candidose provient généralement de source endogène et se caractérise par une prolifération anormale de *C. albicans*. Elle peut survenir chez des sujets sains ou immunodéprimés. En ce sens, 75 % des femmes connaîtront un épisode de vaginite durant leur vie dont 20% deviendront récurrentes (Fidel, Vazquez et al. 1999). De même, les nouveau-nés sont fréquemment atteints de muguet suite à l'acquisition de *C. albicans* durant l'accouchement.

Le spectre clinique de la candidose est vaste. Elle peut survenir à la surface de la peau et des ongles (intertrigo, périonyxis) ou au niveau de la muqueuse vaginale (vaginite), gastro-intestinale (œsophagite, entérite, rectite) et oropharyngée (muguet). La candidurie pour sa part représente 10% à 15% des infections du tractus urinaire contractées en milieu hospitalier (Vazquez and Sobel 2002). La candidose systémique est rare mais demeure tout de même la quatrième cause de septicémie nosocomiale au États-Unis (Chow, Golan et al. 2008). Elle entraîne un taux de mortalité pouvant atteindre 50% (Pfaller, Jones et al. 1998). La candidose disséminée peut survenir suite à la propagation du champignon de la circulation sanguine aux organes profonds. Toutefois, il est présumé que la majorité des infections profondes à *C. albicans* ont pour porte d'entrée le tractus gastro-intestinal. La candidémie afflige particulièrement les patients soumis à une chimiothérapie qui cause une neutropénie (Jarvis 1995).

Les facteurs prédisposant au développement de la candidose peuvent être d'ordre physiologique (âge), endocrinien (diabète, grossesse), hématologique (VIH, neutropénie) et iatrogénique (antibiotiques, stéroïdes, cathéters endovasculaire et urinaire) (Calderone 2002). Chez les individus sains, la candidose peut résulter de changements de la flore microbienne (antibiothérapie), d'un irritant local (cigarette, appareil orthodontique), de xérostémie ou de la diminution de la résistance d'un tissu suite à une infection (Glick and Siegel 1999). Généralement, la candidose se résorbe suite à l'élimination de ces facteurs prédisposants.

1.3 Pathogénèse des infections à *Candida*

1.3.1 Facteurs de virulence

Tel que mentionné précédemment, les infections à *C. albicans* sont principalement d'origine endogène. Les facteurs permettant son passage de l'état de saprophyte à celui de pathogène sont nombreux. Bien que la compétence du système immunitaire représente le facteur prédominant permettant le maintien du champignon à l'état de commensal, *C. albicans* exprime des gènes de virulence pouvant contribuer à sa persistance au niveau des muqueuses ainsi qu'au développement d'infections symptomatiques récurrentes (Tavanti, Campa et al. 2006).

1.3.1.1 L'adhérence

La colonisation des muqueuses de l'hôte par *C. albicans* est une étape essentielle à l'établissement d'une infection. Pour ce faire, ce champignon exprime de nombreuses adhésines, principalement des polysaccharides ou des glycoprotéines situées à la surface (Calderone 2002). Les souches adhérentes de *C. albicans* ont été démontrées comme étant plus virulentes que les souches non-adhérentes (Hoyer 2001; Yang 2003). *HWPI* encode une protéine de surface permettant la liaison covalente aux cellules épithéliales de l'hôte par un mécanisme impliquant une transglutamination (van Burik and Magee 2001; Brown, Odds et al. 2007). Une autre protéine, Int1, semblable à une intégrine, a pour substrat des protéines de la membrane extracellulaire (Sundstrom 2002). La famille des *Agglutinin-like Sequence (ALS)* est composée de 8 gènes encodant de grosses glycoprotéines de surface (Hoyer, Green et al. 2008). Des études de l'expression individuelle de ces gènes à différents sites d'infection par RT-PCR ont permis de renforcer le concept selon lequel les gènes de la famille *ALS* sont régulés de façon spécifique en fonction du site anatomique de l'infection (Hoyer, Green et al. 2008). Finalement, *C. albicans* exprime de nombreuses autres adhésines moins bien caractérisées telles qu'une mannoprotéine inductible en présence d'hémoglobine, les protéines MP58 et MP66, des adhésines fucosyl-lectine, des mannoprotéines et les acides sialiques (Calderone 2002).

1.3.1.2 Les enzymes hydrolytiques

Candida produit des enzymes hydrolytiques lui permettant d'adhérer et de dégrader les tissus de l'hôte ainsi que d'échapper au système immunitaire. Parmi ces enzymes, les plus importantes sont les *secreted aspartyl proteinases* (Sap), la phospholipase B et les lipases (Naglik, Challacombe et al. 2003).

La famille des Saps est composée de dix membres dont huit sont sécrétés alors que les Saps 9 et 10 sont exprimés à la surface cellulaire (Naglik, Challacombe et al. 2003). Ces protéinases sont actives à des pH variant de 2.0 à 7.0, ce qui permet à *C. albicans* de coloniser des tissus à pH neutre (muqueuse buccale) autant qu'acide (muqueuse vaginale) (Schaller, Borelli et al. 2005). Sap2, le membre le plus étudié de la famille des Saps, est connu pour sa capacité à dégrader la couche cornée de l'épithélium humain, la mucine, la lactoferrine et l'immunoglobuline A sécrétoire (IgA), favorisant ainsi l'attachement, la colonisation et la pénétration des tissus de l'hôte (Schaller, Borelli et al. 2005).

Le rôle des Saps dans la virulence de *C. albicans* a été démontré par de nombreuses études *in vivo* et *in vitro* utilisant des inhibiteurs de protéases ainsi que des souches mutantes pour un seul ou plusieurs des gènes *SAP* (Schaller, Borelli et al. 2005). Ces études suggèrent que l'expression individuelle de chacune des Saps diffère selon le site et la progression de l'infection (Schaller, Borelli et al. 2005). Il a également été constaté que les isolats de *C. albicans* provenant de patients atteints d'infection au VIH-1 produisent généralement plus de protéinases que ceux provenant de patients non-infectés, suggérant ainsi que les souches plus virulentes de *C. albicans* sont sélectionnées préférentiellement chez les patients séropositifs (Sweet 1997). La prévalence de la candidose oropharyngée (COP), qui touche 80-95% des patients séropositifs en absence de thérapie antirétrovirale, a drastiquement diminuée depuis l'introduction des *highly active antiretroviral therapy* (HAART) contenant des inhibiteurs de protéases puisque ces inhibiteurs exercent entre autres une action directe sur les Saps (Borg-von Zepelin, Meyer et al. 1999).

C. albicans produit aussi quatre types de phospholipases : PLA, PLB, PLC et PLD. Ces phospholipases causent la lyse cellulaire des tissus de l'hôte en dégradant les liens ester des glycérophospholipides. Chez *C. albicans*, cette activité est principalement associée à la PLB, sécrétée autant par la forme levure que la forme hyphe. La sécrétion de la PLB a été détectée au cours de l'invasion du tractus gastro-intestinal chez la souris ainsi que dans le sérum de patients atteints de candidose disséminée. Les phospholipases ont également été impliquées dans l'adhésion aux cellules épithéliales, la pénétration des tissus ainsi que la transduction de signal (Schaller, Borelli et al. 2005).

1.3.1.3 Le polymorphisme

C. albicans est retrouvé sous trois formes aux sites de la candidose : levure bourgeonnante, pseudohyphe et hyphe. Cette capacité à changer de morphologie en réponse à l'environnement est un facteur de virulence important (Kruppa 2008). Les hyphes exercent une force mécanique aidant la pénétration des tissus épithéliaux et causant des dommages aux cellules endothéliales, ce qui favorise le passage de *C. albicans* de la circulation sanguine aux tissus profonds (Kumamoto and Vines 2005). La formation d'hyphes permet aussi au champignon phagocyté de s'échapper des phagocytes et de les endommager sévèrement (Kumamoto and Vines 2005). Les facteurs de transcription Efg1p et Cph1p régulent la formation des hyphes chez *C. albicans*. Un mutant homozygote nul de *EFG1* et de *CPH1* présente une réduction de prolifération et d'invasion de la muqueuse buccale chez des animaux immunosupprimés (Riggle, Andrutis et al. 1999). Cependant, il a aussi été démontré que la virulence de mutants constitutivement filamenteux était diminuée par rapport à celle de la souche sauvage, ce qui révèle l'importance de la transition réversible de la forme levure à la forme hyphe comme facteur de virulence (Kumamoto and Vines 2005). Récemment, le *quorum sensing* a été décrit comme étant un processus contribuant au contrôle morphologique de *C. albicans* (Kruppa 2008).

1.3.1.4 La transition phénotypique

La grande majorité des souches de *C. albicans* ont la capacité de modifier spontanément et réversiblement leur phénotype, caractérisé entre autres par la morphologie coloniale, à des fréquences variant de 10^{-4} à 10^{-1} (Vargas, Messer et al. 2000). Plus particulièrement, la transition de la phase blanche à la phase opaque est dépendante de l'homozygotie au locus *MTL*, nécessaire à la reproduction sexuée du champignon (Whiteway and Bachewich 2007). Il a été démontré que cette transition d'un phénotype à un autre régule un nombre important de gènes impliqués dans l'interaction de *Candida* avec l'hôte, tels que les gènes *SAP1* et *SAP3*, le gène *CDR3* impliqué dans la résistance aux antifongiques, le gène *WH11* impliqué dans la phase blanche, le gène *OPA4* responsable de la phase opaque et le gène *EFG1* qui régule la transition de levure à hyphes (Vargas, Messer et al. 2000). La transition phénotypique régule aussi un certain nombre de processus impliqués dans la virulence de *C. albicans* comme l'adhérence, la sensibilité aux neutrophiles et aux oxydants ainsi que la transition levure-hyphes (Vargas, Messer et al. 2000). La transition phénotypique semble permettre à *Candida* de s'adapter rapidement à divers environnements (Soll 2004). Des études ont démontré que les souches infectant la cavité orale effectuent cette transition phénotypique à des fréquences supérieures aux souches commensales (Soll 2004).

1.3.2 Les mécanismes de défense immunitaire contre *C. albicans*

1.3.1.2.1 Mécanismes de défense innés

La muqueuse buccale, tout comme la muqueuse gastrique, possède plusieurs facteurs non-immunologiques lui conférant une certaine protection à l'égard de la flore microbienne qui la compose. Dans la cavité buccale, la salive contient un nombre important de protéines possédant une activité antimicrobienne.

Lysozyme

Dans la cavité buccale, le lysozyme est produit par les polymorphonucléaires neutrophiles, les monocytes, les macrophages et les kératinocytes (Niyonsaba and Ogawa 2005). L'activité du lysozyme s'exerce proportionnellement à sa concentration. Il est candidicide à de fortes doses tandis qu'il diminue la concentration et l'activité des Saps à de faibles concentrations (Wu, Samaranayake et al. 1999; Bard, Laibe et al. 2002). Le lysozyme agit aussi en augmentant la phagocytose des polymorphonucléaires neutrophiles et des macrophages (Ibrahim, Matsuzaki et al. 2001).

Lactoferrine

La lactoferrine est une glycoprotéine abondamment retrouvée dans la salive et produite par les polymorphonucléaires neutrophiles ainsi que les cellules épithéliales (Takakura, Wakabayashi et al. 2003). Son activité antifongique à l'égard de *C. albicans*, conférée par sa portion N-terminale (Lupetti, Paulusma-Annema et al. 2000), est attribuée à sa capacité à séquestrer le fer à proximité de *Candida* (Laible and Germaine 1985), à endommager la paroi du champignon (Mazurier and Spik 1980), à induire l'activation d'enzymes autolytiques intracellulaires (Nikawa, Samaranayake et al. 1993) ainsi qu'à stimuler le système immunitaire (Takakura, Wakabayashi et al. 2003). La lactoferrine inhibe la croissance de la forme levure et de la forme hyphes de *C. albicans* et possède une activité antivirale envers le VIH (Bard, Laibe et al. 2002; Takakura, Wakabayashi et al. 2003).

Calprotectine

La calprotectine est une protéine hétérodimérique produite par les kératinocytes, les granulocytes, les monocytes, les macrophages et les neutrophiles. Chez ce dernier type cellulaire, cette protéine représente près de 60% du contenu protéique du cytosol (Kleinegger, Stoeckel et al. 2001; Dale and Fredericks 2005). Son activité antimicrobienne est due en partie à sa capacité à lier le zinc et donc à priver certains microorganismes de cet élément essentiel (Kleinegger, Stoeckel et al.

2001). La calprotectine inhibe la croissance de la forme levure ainsi que la transition de la forme levure à la forme hyphes chez *C. albicans* (Kleinegger, Stoeckel et al. 2001).

Inhibiteurs de protéases leucocytaires sécrétoires

Les inhibiteurs de protéases leucocytaires sécrétoires sont des protéines cationiques, non-glycosylées et hautement basiques composées de deux domaines aux activités enzymatiques distinctes. Ces protéines ubiquitaires sont produites par les neutrophiles, les macrophages et les cellules épithéliales des membranes muqueuses. Elles sont retrouvées dans plusieurs fluides humains tels que la salive, le lait maternel et les larmes. Leur rôle principal est la protection des tissus contre les effets dévastateurs de l'inflammation, en inhibant les élastases et autres protéases produites par les neutrophiles. Elles possèdent une activité antifongique à l'égard de *C. albicans* et une activité antivirale à l'égard du VIH-1 (Doumas, Kolokotronis et al. 2005).

Peroxydases

Il existe deux types de peroxydases provenant de sources différentes dans la cavité orale : la peroxydase salivaire produite par les glandes parotides et submandibulaires et la myéloperoxydase produite par les glandes salivaires et les polymorphonucléaires neutrophiles (Edgerton and Koshlukova 2000; Ihalin, Loimaranta et al. 2006). Les peroxydases possèdent un mécanisme d'action non-spécifique, affectant autant les bactéries Gram-positives que Gram-négatives ainsi que les virus et les champignons (Ihalin, Loimaranta et al. 2006). Il a été démontré par des études *in vitro* que les peroxydases inhibent la croissance de *C. albicans* (Lenander-Lumikari 1992). Cependant, les concentrations physiologiques de phosphate contenues dans la salive annulent l'effet candidicide de ces dernières (Lenander-Lumikari 1992).

Histatines

Les histatines consistent en de petits peptides cationiques produits constitutivement et sécrétés par les glandes submandibulaires, sublinguales et parotides (De Smet and Contreras 2005). L'histatine 5 (Hst-5) est le membre de la famille possédant la plus grande activité antifongique envers *C. albicans* (Edgerton and Koshlukova 2000). *In vitro*, Hst-5 tue *Candida* sous forme de levure et d'hyphe à des concentrations physiologiques (Edgerton and Koshlukova 2000). L'histatine-5 se lie à des récepteurs protéiques spécifiques de la paroi du champignon puis est internalisée par translocation. À l'intérieur de la cellule, Hst-5 cible les mitochondries, cause une perte d'ATP, de potassium et de magnésium et induit la mort cellulaire (Vylkova, Sun et al. 2007; Torres, Garzino-Demo et al. 2008). Une étude récente démontre que le niveau de colonisation par *C. albicans* est significativement augmenté chez les individus séropositifs alors que les concentrations d'Hst-5 chez ces mêmes individus sont significativement diminuées. Ceci pourrait contribuer, en partie, à la prédisposition de cette population à la candidose oropharyngée (Torres, Garzino-Demo et al. 2008).

Défensines

Les défensines sont des peptides cationiques divisés en deux sous-familles : les α -défensines et les β -défensines (Vylkova, Sun et al. 2007). Les α -défensines sont produites par les neutrophiles, contenues dans les granules azurophiles et relâchées durant l'inflammation et la phagocytose (De Smet and Contreras 2005; Vylkova, Sun et al. 2007). Les β -défensines sont produites par les cellules épithéliales et sont impliquées dans l'immunité innée et acquise puisqu'elles présentent une activité antimicrobienne et chimiotactique (Joly, Maze et al. 2004). Les β -défensines hBD-2 et hBD-3 présentent une activité fongicide à l'égard de *C. albicans* ainsi qu'une activité antivirale envers le VIH-1 (Dale and Fredericks 2005). Certaines β -défensines sont exprimées constitutivement alors que d'autres sont produites en réponse à l'inflammation ou à des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-1 β) ou encore au LPS (Dale and Fredericks 2005).

1.3.2.2 Mécanismes de défense cellulaires résidents de la muqueuse oropharyngée

1.3.2.2.1 Les kératinocytes

Les kératinocytes sont d'une importance cruciale dans la pathogénèse de la candidose oropharyngée puisqu'ils constituent une barrière physique suite à l'adhérence de *C. albicans* à l'épithélium de la muqueuse buccale (Schonwetter, Stolzenberg et al. 1995). Ces cellules ont également la capacité de contrer la colonisation des surfaces muqueuses par le champignon en agissant directement et indirectement sur ce dernier. Les kératinocytes expriment à leur surface une glycoprotéine impliquée dans la desquamation, la desquamine, dont l'expression est augmentée par l'IFN- γ (Brysk, Bell et al. 1991). La desquamation, qui consiste en la perte des couches superficielles de l'épithélium, permet d'éliminer *Candida* de la portion superficielle de l'épithélium (Brysk, Bell et al. 1991).

Les kératinocytes permettent de contrer l'invasion de *C. albicans* en agissant indirectement sur ce dernier via la sécrétion d'une grande variété de cytokines. Ces cellules produisent des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- α), des cytokines favorisant le recrutement des lymphocytes T (IL-7 et IL-15) et des immunomodulateurs aux effets antagonistes (IL-10, IL-12 et IL-18) (Grone 2002). L'expression de ces cytokines est induite durant l'inflammation par une variété de stimuli externes provenant des leucocytes, des cellules de Langerhans et des kératinocytes eux-mêmes. Parmi ceux-ci, notons l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-17 (Matsuura, Otsuka et al. 1998; Teunissen, Koomen et al. 1998). Les kératinocytes expriment également de nombreux récepteurs à leur surface tels que le récepteur de l'IL-4, de l'IL-13, de l'IL-17 et de l'IL-2 (Grone 2002).

Un modèle de candidose vaginale utilisant un épithélium humain reconstitué (RHVE) a permis de démontrer que les Saps produites par *C. albicans* induisent la production d'IL-1 α , d'IL-1 β , d'IL-6, d'IL-8, d'IL-10, du GM-CSF, de l'IFN- γ et du TNF- α par les kératinocytes (Schaller, Korting et al. 2005). Ce même groupe avait obtenu des résultats similaires en étudiant la production de cytokines par les

kératinocytes dans un modèle de candidose cutanée utilisant un épiderme humain reconstitué (RHE) (Schaller, Mailhammer et al. 2002).

Les kératinocytes ont également la capacité d'agir directement sur *Candida* par divers mécanismes au potentiel antimicrobien. Ces cellules expriment la monoxyde d'azote synthase inductible (iNOS), responsable de la production de monoxyde d'azote (NO) exerçant une activité fongicide à l'égard de *C. albicans* (Jones-Carson, Vazquez-Torres et al. 1995). Il semble que l'expression de cette enzyme soit induite, chez les kératinocytes, par l'action autocrine de l'IL-8 (Bruch-Gerharz, Fehsel et al. 1996). Les kératinocytes sécrètent également des peptides antimicrobiens tels que la calprotectine, les β -défensines 1 à 3 (Dunsche, Acil et al. 2001; Dunsche, Acil et al. 2002; Liu, Destoumieux et al. 2002) ainsi que des inhibiteurs de protéase leucocytaire sécrétoire (Wiedow, Harder et al. 1998). Finalement, les kératinocytes inhibent la croissance de *C. albicans in vitro* par un mécanisme encore méconnu qui requiert obligatoirement un contact direct avec une cellule épithéliale intacte (Yano, Lilly et al. 2005).

C. albicans est reconnu par les kératinocytes via des *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) exprimés à leur surface. L'un d'eux, un récepteur liant le mannose (KcMR), a été identifié comme un médiateur de l'activité candidicide des kératinocytes (Szolnoky, Bata-Csorgo et al. 2001). Les kératinocytes expriment aussi les *Toll-like receptors* (TLRs) 2 et 4 à leur surface (Pivarcsi, Bodai et al. 2003). Les TLRs sont des récepteurs transmembranaires impliqués dans l'induction de réponses antimicrobiennes chez différents types cellulaires (Pivarcsi, Kemeny et al. 2004). Il a été démontré que *C. albicans* lie le TLR2, causant ainsi l'augmentation de la production d'IL-8 par les kératinocytes (Pivarcsi, Bodai et al. 2003). Récemment, une étude utilisant un RHE a permis de démontrer que le TLR4 protège directement la muqueuse buccale des infections à *C. albicans* via un processus médié par les polymorphonucléaires neutrophiles (Weindl, Naglik et al. 2007). Finalement, le rôle protecteur des kératinocytes semble avéré dans le cadre de la candidose oropharyngée puisque les hyphes de *C. albicans* sont confinées à la couche superficielle de l'épithélium de la muqueuse buccale (Eversole, Miyasaki et al. 1993).

1.3.2.2.2 Cellules de Langerhans

Les cellules de Langerhans (LCs) sont des cellules dendritiques (DCs) immatures dérivées de la moëlle osseuse (Berger, Vasquez et al. 2006; Koch, Kohl et al. 2006). Elles sont retrouvées dans les couches basales et suprabasales de l'épiderme de la peau et des muqueuses (Koch, Kohl et al. 2006). Phénotypiquement, les cellules de Langerhans sont caractérisées par l'expression des molécules de surface CD1a, langerine/CD207, CD11c et E-cadhérine. Ces cellules expriment également le CMH de classe 2, ce qui en fait des cellules aptes à la présentation antigénique aux cellules T (Berger, Vasquez et al. 2006).

Les cellules de Langerhans sont d'origine myéloïde et leur différenciation à partir des monocytes périphériques est médiée par le TGF- β , le GM-CSF, l'IL-4 et le Notch-ligand δ -1 (Hoshino, Katayama et al. 2005). Les kératinocytes sécrètent le TGF- β , le GM-CSF et le Notch-ligand δ -1 ainsi que la chimiokine CCL20 dont le récepteur, CCR6, est exprimé par les LCs (Koch, Kohl et al. 2006). Des souris déficientes pour ce récepteur sont incapables de recruter des DCs à la muqueuse buccale (Iwasaki 2007).

Les LCs sont nombreuses dans la muqueuse oropharyngée. Elles y agissent en tant que sentinelles grâce à leurs propriétés phagocytaires et macropinocytaires. Les DCs et les LCs ont la capacité unique d'effectuer la présentation croisée, c'est-à-dire d'activer à la fois les lymphocytes T CD8 et CD4 via les CMH de classe 1 et 2 respectivement (Banchereau, Briere et al. 2000). Les DCs et probablement les LCs peuvent également interagir de façon bidirectionnelle avec les cellules *natural killer* (NK) et les cellules T $\gamma\delta$ (Berger, Vasquez et al. 2006).

Les DCs reconnaissent *C. albicans* par les PRRs présents à leur surface. Ceux-ci comprennent le récepteur mannose-fucose (Pietrella, Bistoni et al. 2006), les récepteurs de type C-lectine tels que dectine-1 et DC-SIGN, ainsi que les TLR2 et 4 (Cambi, Netea et al. 2008). La dectine-1 reconnaît spécifiquement le β -glucane, peut médier la phagocytose tout comme le TLR2 et collabore avec ce dernier à

l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires par les DCs (Chai, Netea et al. 2008). DC-SIGN est impliqué dans la liaison et l'internalisation de *C. albicans* par les DCs (Cambi, Netea et al. 2008). Une étude récente démontre que DC-SIGN peut lier le zymosan ainsi que le mannane et que la *N*-mannosylation est nécessaire à la liaison, à la phagocytose et au « *sensing* » du champignon par les DCs (Cambi, Netea et al. 2008). Finalement, la morphologie de *C. albicans* module la réponse immunitaire induite par les DCs. L'ingestion de la forme levure induit une réponse protectrice Th1 à l'égard du pathogène alors que l'ingestion de la forme hyphé ou d'un grand nombre de levures induit une réponse Th17 (Romani 2000; Acosta-Rodriguez, Rivino et al. 2007; Zelante, De Luca et al. 2007).

1.3.3 Mécanismes de défense cellulaires recrutés à la muqueuse oropharyngée

1.3.3.1. Macrophages

Les macrophages sont d'origine myéloïde et proviennent de la différenciation des monocytes circulants (Gordon and Taylor 2005). Cette population cellulaire joue un rôle crucial dans la défense de l'hôte. Les macrophages sont impliqués dans la reconnaissance des pathogènes, dans la présentation antigénique aux lymphocytes, dans la modulation de la réponse immunitaire ainsi que dans la destruction des pathogènes. Bien que l'expression de leur marqueurs de surface varie en fonction de leur niveau de maturation, ces cellules expriment généralement les marqueurs de surface CD4, CD14, CD11b et F4/80 (souris seulement) ainsi que le CMH de classe 2 et le récepteur du fragment Fc (FC γ R) (Barbeau and Deslauriers 1989; Lai, Alaverdi et al. 1998).

Les macrophages forment une population hétérogène qui reflète la spécialisation fonctionnelle de ces cellules selon leur localisation anatomique. On reconnaît entre autres les macrophages alvéolaires, les cellules de Kupffer du foie, les macrophages spléniques et les macrophages dérivés des monocytes inflammatoires (Gordon and Taylor 2005). Les macrophages sont également subdivisés en deux sous-groupes (M1/M2) en fonction de leur mécanisme et phénotype d'activation

(Martinez, Sica et al. 2008). L'activation classique (M1) des macrophages se produit suite à une stimulation via l'IFN- γ ou via certains produits microbiens tel le LPS. Cette stimulation induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-15, IL-18, TNF- α et IL-12) et de chimiokines (MCP-1, CCL20) ainsi que l'augmentation de l'expression du CMH de classe 2 et de molécules de co-stimulation (figure 2). Ces macrophages favorisent le développement d'une réponse Th1. Fonctionnellement, les macrophages M1 sont caractérisés par une augmentation de la phagocytose et l'expression élevée de l'enzyme iNOS responsable de la production de NO. L'activation alternative (M2a) des macrophages est le résultat de la stimulation par l'IL-4 ou l'IL-13. Cette stimulation induit une augmentation de l'expression de plusieurs récepteurs de surface, dont le récepteur du mannose (CD206). Les macrophages M2a régulent négativement la production de cytokines pro-inflammatoires et leur capacité microbicide à l'égard des pathogènes intracellulaires est grandement compromise puisqu'ils n'expriment pas l'enzyme iNOS (figure 2). Les macrophages M2b favorisent le développement d'une réponse de type Th2 alors que les macrophages M2c limitent la durée et l'intensité des réactions immunitaires et inflammatoires (figure 2) (Martinez, Sica et al. 2008).

Dans la muqueuse buccale normale, les macrophages sont retrouvés dans la lamina propria. De plus, de nouveaux macrophages dérivés de monocytes sont recrutés à la muqueuse buccale 5 à 6 jours suivant la primo-infection au cours de la candidose oropharyngée chez la souris (Chakir, Cote et al. 1994). Ces macrophages expriment le récepteur du mannose, le CD14 et les TLRs (Medzhitov and Janeway 1998). L'IFN- γ produit par les cellules T $\gamma\delta$ augmente la production de NO par les macrophages et augmente la résistance à la candidose oro-gastrique (Jones-Carson, Vazquez-Torres et al. 1995). Les macrophages favorisent également la résistance à la candidose en sécrétant des cytokines pro-inflammatoires (Vazquez-Torres and Balish 1997). Ces cellules exercent aussi une action directe sur *C. albicans* via plusieurs mécanismes. Ils phagocytent le champignon, produisent du lysozyme et des défensines ainsi que des intermédiaires réactifs de l'oxygène et de l'azote, dont le monoxyde d'azote et le peroxy-nitrite. Ils présentent également une activité fongicide

à l'égard de la forme levure et de la forme hyphes de *C. albicans* (Vazquez-Torres and Balish 1997).

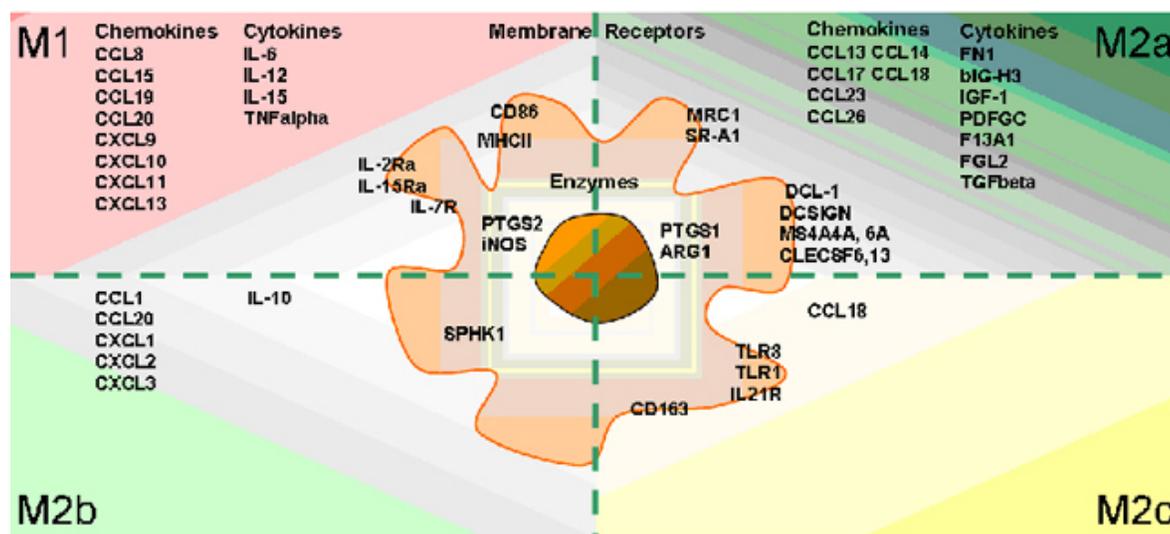


Figure 2 : Polarisation phénotypique des macrophages et expression des gènes, cytokines, chimiokines et récepteurs de surfaces associés (tiré de Martinez & al, 2008).

1.3.3.2 Les polymorphonucléaires (PMNs)

Les polymorphonucléaires neutrophiles sont des granulocytes d'origine myéloïde provenant de la moëlle osseuse. Ils s'y différencient en myéloblastes et myélocytes avant d'achever leur maturation en polymorphonucléaires neutrophiles puis sont orientés vers la circulation sanguine. Ces cellules, caractérisées par leur noyau multilobé, sont donc principalement retrouvées dans le sang (Medzhitov and Janeway 2000) et sont par conséquent absents de la muqueuse buccale saine (Ashman and Papadimitriou 1995).

Les neutrophiles sont les premières cellules recrutées à la muqueuse buccale suite à l'infection expérimentale à *Candida* chez la souris (Ashman and Papadimitriou 1995). Ils sont retrouvés dans les couches supérieures de l'épithélium

24 à 48 heures après l'infection à *C. albicans* (Lacasse, Fortier et al. 1990). La migration trans-épithéliale des neutrophiles, mise en évidence par l'histopathologie, est d'ailleurs considérée comme étant caractéristique des lésions observées dans la COP (Challacombe 1994). Le rôle majeur des neutrophiles dans la protection contre les infections à *C. albicans* repose également sur le fait que les patients neutropéniques sont particulièrement susceptibles à la candidose orale (Epstein, Hancock et al. 2003).

Les neutrophiles sont importants dans la résistance à la candidose puisqu'ils exercent une action directe sur *C. albicans*. Ils inactivent la forme hyphes via la production d'anions superoxyde, de peroxyde d'hydrogène et de myéloperoxydase (Diamond, Clark et al. 1980) et phagocytent la forme levure en plus de présenter une activité fongicide à leurs égards (Marquis, Lewandowski et al. 2006). Une étude récente utilisant un RHE a permis de démontrer que les PMNs médient une forte augmentation de l'expression de TLR4 par les kératinocytes et que celle-ci protège directement les cellules épithéliales contre l'invasion par les hyphes de *C. albicans*. Selon cette étude, le TNF- α joue également un rôle essentiel dans cette protection puisqu'il est sécrété par les kératinocytes en réponse à *C. albicans* et que sa neutralisation à l'aide d'anticorps spécifiques conduit à une forte inhibition de l'expression de TLR4, malgré la présence de PMNs (Weindl, Naglik et al. 2007).

1.3.3.3 Cellules NK

Les cellules *natural killer* (NK) représentent une sous-population de lymphocytes participant à l'immunité innée. Ces cellules sont confinées principalement à la circulation sanguine mais peuvent migrer aux tissus en réponse à certains chimio-attractants (Moretta, Bottino et al. 2002). Les cellules NK présentent peu ou pas d'effet sur *C. albicans* (Beno, Stover et al. 1995). Cependant, il a été démontré que des souris transgéniques (Tg ϵ 26) possédant un défaut combiné de cellules NK et de lymphocytes T sont extrêmement susceptibles à la candidose oropharyngée. Les phagocytes de ces souris perdent leur capacité protectrice à l'égard de la candidose systémique et il est connu que les cellules NK produisent de

l'IFN- γ , qui active les phagocytes (Balish, Warner et al. 2001). Par ailleurs, une autre étude a permis de démontrer que *C. albicans*, sous forme hyphe ou levure, peut inhiber la production d'IFN- γ par les cellules NK (Murciano, Villamon et al. 2006). Il est donc possible que les cellules «*natural killer*» exercent un effet indirect sur le champignon.

1.3.3.4 Lymphocytes T

Les lymphocytes T ont pour progéniteurs les cellules souches hématopoïétiques de la moëlle osseuse. Ces cellules subissent les premières étapes de maturation dans le thymus où elles prolifèrent, se différencient et sont sélectionnées pour la reconnaissance d'antigènes exogènes (Paul 2008). Les lymphocytes T reconnaissent leurs antigènes via le récepteur de cellules T (TCR) composé des chaînes α et β ou γ et δ . Les lymphocytes T $\alpha\beta$ et $\gamma\delta$ se distinguent par leurs nombres et leurs fonctions (Janeway 2007, Paul 2008). Deux types de lymphocytes T $\alpha\beta$ sont caractérisés par l'expression des molécules de surface CD4 ou CD8. Ces lymphocytes T sont distribués aléatoirement dans l'épithélium de la muqueuse buccale, souvent en petits foyers de part et d'autre de la membrane basale (van Loon, Krieg et al. 1989). Dans l'épithélium oral humain normal, le ratio CD4/CD8 est de 1:2 alors qu'il est de 2:1 dans la muqueuse orale saine de la souris (van Loon, Krieg et al. 1989; Bolduc, Waterfield et al. 1990; Lacasse, Fortier et al. 1990).

1.3.3.4.1. Lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T CD4 jouent un rôle crucial dans la protection contre *C. albicans* tel que confirmé par la corrélation directe établie entre leur réduction en nombre et l'incidence de la COP (Fidel 2002). Ce rôle a également été démontré par l'élimination du champignon de la muqueuse buccale et gastrique chez un modèle murin suite au transfert adoptif de lymphocytes T CD4 naïfs (Farah, Elahi et al. 2002).

Au cours des dernières années, différents sous-types de lymphocytes T ont été décrits. Bien que certains constituent des lignées distinctes à la sortie du thymus

(lymphocytes T régulateurs naturels (nTreg)), plusieurs sont le résultat de voies de différenciation alternatives. Celles-ci sont déterminées par les signaux reçus lors de l'interaction initiale des lymphocytes T CD4 naïfs avec l'antigène (Zhu and Paul 2008). Jusqu'à maintenant, on reconnaît les lymphocytes Th1, Th2, Th17 et T régulateurs induits (iTreg) qui génèrent des réponses immunitaires distinctes envers *C. albicans*.

Lymphocytes Th1

Les lymphocytes CD4 naïfs se différencient en lymphocytes Th1 via l'action de l'IL-12 sécrétée par les DCs et de l'IFN- γ . Ils sont responsables de la protection de l'organisme envers les pathogènes intracellulaires, principalement via la sécrétion d'IL-2 et d'IFN- γ (Zhu and Paul 2008). Ces lymphocytes sont également essentiels à la protection de l'hôte contre les infections fongiques (Romani 2008). L'IFN- γ et l'IL-12 activent les mécanismes antimicrobiens des phagocytes (mécanismes dépendants et indépendants de l'oxygène ou de l'azote, dégranulation) responsables de l'élimination de *C. albicans* (Dongari-Bagtzoglou and Fidel 2005). Le rôle central de ces lymphocytes dans la protection contre la COP est toutefois remis en cause par une étude récente démontrant que des souris déficientes en lymphocytes Th1 présentent une COP moins sévère que des souris déficientes en lymphocytes Th17 (Conti, Shen et al. 2009).

Lymphocytes Th2

Les lymphocytes CD4 naïfs se différencient en lymphocytes Th2 via l'action de l'IL-2 et de l'IL-4 et sont impliqués dans la défense de l'hôte envers les pathogènes extracellulaires et le développement d'allergies (Zhu and Paul 2008). La génération d'une réponse cellulaire Th2 est également associée à une plus grande sévérité des infections fongiques (Romani 2008). Ces lymphocytes produisent, entre autres, de l'IL-4, de l'IL-10 et de l'IL-13 (Zhu and Paul 2008). La sécrétion d'IL-4 par les lymphocytes Th2 inhibe les fonctions antifongiques des phagocytes et le développement d'une réponse protectrice Th1 (Romani 2008). Suite à un traitement à

l'IL-4 et/ou à l'IL-10, des souris résistantes à la candidose oro-gastrique deviennent sensibles à cette même infection (Calderone 2002).

Lymphocytes Th17

La différenciation des lymphocytes T CD4 naïfs en Th17 est médiée par la sécrétion d'IL-6 et de TGF- β et est stabilisée par l'action de l'IL-23 produite par les DCs (Romani 2008). Ces lymphocytes Th17 sont responsables de la protection contre les pathogènes extracellulaires et les champignons (Weaver, Harrington et al. 2006). Une étude utilisant un modèle murin de candidose gastro-intestinale et systémique démontre que ces lymphocytes régulent négativement le développement d'une réponse Th1 et exacerbent l'inflammation et l'infection produite par le champignon en inactivant les capacités antifongiques des PMNs (Zelante, De Luca et al. 2007). Une étude récente utilisant un modèle murin déficient en Th17 a cependant démontré l'importance primordiale de ces lymphocytes dans la protection envers la COP et l'implication des PMNs dans ce processus. Ces souris déficientes en Th17 développent une infection buccale sévère à *C. albicans* et le recrutement de PMNs au site d'infection est altéré chez ces animaux. Tel que mentionné précédemment, cette étude a également démontré l'importance relative des lymphocytes Th1 dans la protection envers la COP (Conti, Shen et al. 2009). Pirofski & Casadevall suggèrent que les mécanismes de défense que possèdent les lymphocytes Th1 et Th17 agissent en synergie afin de maximiser l'élimination du pathogène tout en minimisant le dommage tissulaire engendré par l'inflammation, deux processus médiés par l'action des PMNs (Pirofski and Casadevall 2009).

Lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs se subdivisent en deux catégories : les T régulateurs naturels et les T régulateurs induits. Les premiers sont différenciés à leur sortie du thymus alors que les seconds sont induits par le TGF- β et l'IL-2 suite à l'inflammation (Romani 2008; Zhu and Paul 2008). Des Tregs présentant une activité tolérogénique ont été décrits dans le cadre d'infections fongiques autant chez la souris que chez l'homme. Dans un modèle de candidose systémique et gastro-

intestinale, des Tregs produisant de l'IL-10 et du TGF- β ont été détectés. La production de ces cytokines pourrait contribuer à la persistance de *C. albicans* dans le tractus gastro-intestinal et ainsi permettre l'établissement d'une mémoire immunitaire à l'égard du champignon (Romani 2008). Cette dernière fonction des lymphocytes T régulateurs a d'ailleurs été démontrée à l'aide de souris déficientes en Tregs qui survivent à la candidose systémique mais succombent à la réinfection par *C. albicans* alors qu'elles y survivent suite au transfert adoptif de Tregs (Montagnoli, Bacci et al. 2002).

1.3.3.4.2 Lymphocytes T CD8

L'accumulation de lymphocytes T CD8 à l'interface compris entre la lamina propria et l'épithélium dans le cadre de la COP chez des patients atteints d'infection au VIH-1 démontre que ces cellules sont activement recrutées à la muqueuse (Myers, Leigh et al. 2003). Il a également été démontré que ces lymphocytes sont requis afin de limiter la charge buccale de *C. albicans* chez des souris transgéniques exprimant le génome du VIH-1 (Marquis, Lewandowski et al. 2006). Les lymphocytes T CD8 activés par l'IL-2 inhibent la croissance des hyphes de *C. albicans in vitro* (Beno, Stover et al. 1995). Ces cellules produisent également des cytokines comme l'IFN- γ qui augmentent l'activité fongicide des macrophages et des neutrophiles (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004).

1.3.3.4.3 Lymphocytes T $\gamma\delta$

Contrairement aux lymphocytes décrits précédemment, le TCR des lymphocytes T $\gamma\delta$ est composé des chaînes γ et δ (Paul 2008). Ces lymphocytes représentent environ 2% de la population de cellules T retrouvée dans la muqueuse buccale normale (Pepin, Roger et al. 1993) et leur nombre augmente suite à la colonisation et à l'infection par *C. albicans*. Cette augmentation coïncide d'ailleurs avec la résolution de l'infection (Chakir, Cote et al. 1994). Il est connu que les lymphocytes T $\gamma\delta$ participent à la réponse immunitaire contre les pathogènes en

produisant des cytokines (IFN- γ) et en établissant un contact direct cellule à cellule menant à la cytotoxicité (Lundqvist, Baranov et al. 1994). Ces lymphocytes participent également à la résistance à la candidose en augmentant la production de NO par les macrophages (Jones-Carson, Vazquez-Torres et al. 1995).

1.3.3.5. Lymphocytes B

Les lymphocytes B proviennent des cellules souches hématopoïétiques de la moëlle osseuse et s'y développent jusqu'au stade de lymphocytes B immatures. Suite à la rencontre avec leur antigène spécifique, ces cellules se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps ou en cellules B mémoires. Ce sont ces cellules qui produisent les immunoglobulines A (IgA) retrouvées dans la salive (Janeway 2007).

Le rôle des lymphocytes B dans la défense de l'hôte durant la COP n'a pas été établi jusqu'à maintenant (Fidel 2002). Une étude comparative ne démontrant aucune différence dans la composition en anticorps de la salive de patients atteints ou non du VIH, souffrant ou non de COP, a suggéré que l'immunité humorale n'avait aucun rôle dans la protection contre cette infection (Wozniak, Leigh et al. 2002). Cependant, des souris déficientes en lymphocytes B étaient plus susceptibles à l'infection systémique à *C. albicans*, suggérant un rôle des lymphocytes B dans la protection contre ce type de candidose (Wagner, Vazquez-Torres et al. 1996).

Chapitre 2 : La candidose dans le contexte de l'infection au VIH

2.1 Histologie de la muqueuse buccale et digestive

2.1.1 La muqueuse buccale

La muqueuse buccale est composée de deux couches tissulaires majeures : l'épithélium pavimenteux stratifié en surface et la lamina propria sous-jacente, qui sont séparés par la membrane basale. Cette muqueuse présente également des variations structurelles considérables selon la région de la cavité buccale. Trois types distincts de muqueuse sont reconnus : la muqueuse bordante, la muqueuse masticatoire et la muqueuse spécialisée (Nanci 2003). La muqueuse bordante représente 60 % de la surface totale de la cavité buccale et compose la face ventrale de la langue, les lèvres, la joue, le palais mou et le plancher de la bouche. Cet épithélium non-kératinisé se divise en quatre strates, soient le *stratum germinatum* reposant sur la membrane basale, le *stratum spinosum*, le *stratum granulosum* et le *stratum corneum*. Les cellules progénitrices de l'épithélium sont retrouvées dans les deux premières couches. Au cours de leur migration vers les strates superficielles, ces cellules sont soumises à différentes étapes de maturation menant ou non à la kératinisation (Nanci 2003). Lors de ces étapes de maturation, les cellules progénitrices subissent des changements de taille et de morphologie et accumulent différentes protéines cytoplasmiques (Squier and Kremer 2001). La muqueuse masticatoire représente pour sa part 25% de la surface totale de la cavité buccale et compose les gencives et le palais dur. Ces régions sont généralement kératinisées. Finalement, la muqueuse spécialisée couvre 15% de la muqueuse buccale et se retrouve à la surface dorsale de la langue, décrite à la section suivante (Nanci 2003).

La lamina propria est composée de tissu conjonctif et est située entre l'épithélium et la sous-muqueuse. Tel que mentionné pour l'épithélium pavimenteux stratifié, elle présente des variations régionales, particulièrement en ce qui concerne l'organisation et la concentration des fibres de collagène. Plusieurs types cellulaires sont retrouvés dans la lamina propria. Parmi ceux-ci, notons les fibroblastes, les

macrophages, les mastocytes et les lymphocytes. En conditions d'inflammation aiguë, les polymorphonucléaires représentent le type cellulaire dominant dans la lamina propria alors qu'en conditions chroniques, les monocytes/macrophages et les lymphocytes prédominent (Nanci 2003).

L'histologie de la muqueuse buccale est comparable chez l'homme et la souris. Cependant, l'épaisseur de cette dernière est réduite de trois à cinq fois chez la souris (Hill, Berg et al. 1981).

2.1.2 La langue

La langue est un organe musculaire enveloppé d'une membrane muqueuse. Elle se divise en trois régions : l'apex, le corpus et la base. Les deux premières régions forment le 2/3 antérieur de la langue parcouru par le sillon médian et entièrement localisé dans la cavité buccale. La face dorsale de l'apex et du corpus, composée d'épithélium pavimenteux stratifié spécialisé, est recouverte des papilles linguales divisées en quatre types : les papilles filiformes, fongiformes, circumvallées et foliées (Provenza 1988). La surface externe de ces papilles est composée d'épithélium kératinisé alors que l'épithélium compris entre elles est non-kératinisé (Schroeder 1991). Les papilles filiformes sont responsables de la texture particulière de la langue. Elles sont les plus abondantes et sont disposées en rangées parallèles à la surface de la langue. Le *stratum germinatum* y est irrégulier ce qui reflète le contour de la lamina propria. Les papilles fongiformes sont quant à elles dispersées aléatoirement parmi les papilles filiformes. Les papilles circumvallées sont les plus grosses et les moins abondantes. Elles sont formées de 10 à 12 papilles alignées en forme de V et situées au tiers postérieur de la langue, devant les amygdales linguales. La face dorsale de la langue est considérablement plus épaisse que la face ventrale, tant au niveau de l'épithélium que de la lamina propria. La face ventrale de la langue est composée de muqueuse bordante, est non-kératinisée et dépourvue de papilles (Provenza 1988).

2.1.3 L'estomac

Chez l'homme, l'épithélium pavimenteux stratifié couvre le tractus gastro-intestinal de la muqueuse buccale à la jonction gastro-oesophagienne, pour être ensuite remplacé au niveau de l'estomac et du petit et gros intestin par un épithélium glandulaire. L'estomac communique avec l'œsophage par le cardia et avec le duodénum par le pylore (Weiss 1984). L'épithélium borde la lumière et repose sur la lamina propria composée de tissu conjonctif lâche, de tissu lymphoïde, de glandes ainsi que de vaisseaux sanguins et lymphatiques. Sous cette couche de tissu conjonctif se trouve la muscularis mucosae, qui consiste en une mince couche de muscles lisses disposés en feuillets, supportée par la sous-muqueuse composée de tissu conjonctif dense. Sous cette dernière, on retrouve la musculeuse, essentiellement musculaire et beaucoup plus épaisse que la muscularis mucosae, et finalement la couche séreuse qui représente la paroi externe de l'estomac (Hould 1982). La portion supérieure du tractus gastro-intestinal (cavité buccale, larynx, pharynx et portion supérieure de l'œsophage) est dépourvue de muscularis mucosae et de sous-muqueuse (Squier and Kremer 2001). Chez la souris, contrairement à l'homme, l'épithélium pavimenteux stratifié se prolonge jusqu'à la première moitié de l'estomac. Au centre de l'estomac de la souris se trouve le *cardial-atrium fold*, un repli musculaire formé par une protrusion de la lamina propria séparant l'épithélium pavimenteux stratifié en amont du tissu glandulaire en aval (Maronpot 1999). Ce repli de l'estomac de la souris est densément peuplé de cellules immunitaires et est particulièrement susceptible à la colonisation par la forme hyphe de *C. albicans* (Calderone 2002).

2.2. Types de candidoses associés au VIH

La COP est l'infection fongique opportuniste la plus fréquemment diagnostiquée chez les patients infectés au VIH. Près de 90 % d'entre eux connaîtront au moins un épisode de COP au cours de la progression de la maladie vers la phase SIDA (Samaranayake 1992). Les lésions buccales causées par la COP constituent d'ailleurs l'un des premiers signes cliniques de cette progression (Leigh, Shetty et al. 2004). Depuis l'apparition des «thérapies antirétrovirales hautement actives» (HAART) utilisant un inhibiteur de protéase, l'incidence et la prévalence de la COP ont drastiquement diminué dans les pays industrialisés. Cependant, plusieurs patients séropositifs n'ont pas accès à des thérapies adéquates et sont par conséquent toujours susceptibles à la COP, notamment dans certains pays d'Afrique.

La COP peut se présenter sous différentes formes telles que la candidose pseudo-membranaire, la candidose érythémateuse, la perlèche et la candidose hyperplasique chronique, et peut se compliquer d'une candidose œsophagienne.

La candidose pseudo-membranaire

Cette forme de candidose, communément appelée muguet, est caractérisée par l'apparition de lésions blanches ou jaunâtres pouvant être délogées à l'aide d'un abaisse-langue et révélant une muqueuse sous-jacente rougeâtre ou légèrement ensanglantée (figure 3). Ces lésions peuvent être localisées ou retrouvées sur la totalité de la muqueuse buccale (Reichart, Khongkhunthian et al. 2003). Le diagnostic de la candidose pseudo-membranaire est facilité par la présence d'hyphes ou de pseudohyphes à la surface des lésions. Dans certains cas, les hyphes pénètrent profondément l'épithélium, parfois jusqu'au *stratum spinosum* (Farah, Ashman et al. 2000). Cette forme de COP est la plus répandue chez les patients séropositifs et survient plus fréquemment lorsque les décomptes de lymphocytes T CD4+ circulants sont inférieurs à 200 cellules/ μ L de sang (Liu, Liu et al. 2006).

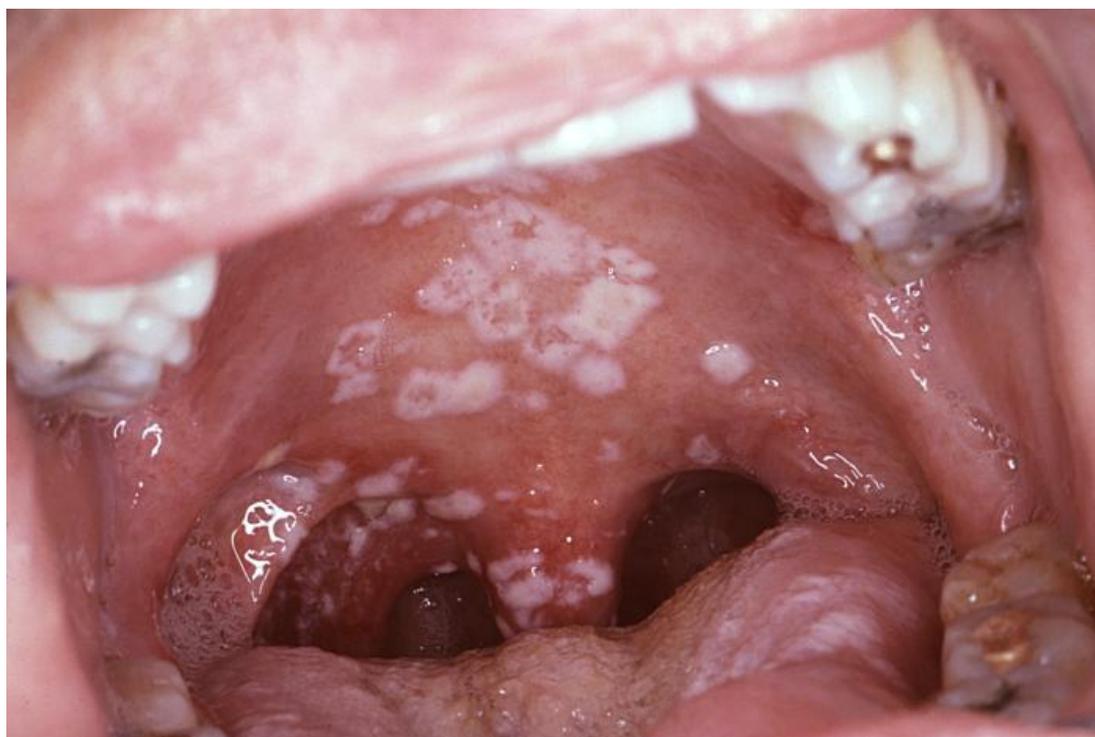


Figure 3 : La candidose pseudomembranaire

La candidose érythémateuse

La candidose érythémateuse (figure 4) est caractérisée par l'apparition de plaques rougeâtres sur le palais, la face dorsale de la langue et l'oropharynx bien qu'elles puissent être localisées sur toutes les surfaces de la cavité buccale (Reichart, Khongkhunthian et al. 2003). Les lésions à la surface de la langue s'accompagnent fréquemment de la perte de papilles (Farah, Ashman et al. 2000). Le diagnostic de cette forme de COP est rendu difficile par le peu d'hyphes présentes au site d'infection et nécessite souvent une biopsie suivie d'une coloration à l'acide de Schiff (PAS) (Greenspan, Barr et al. 1992). La candidose érythémateuse semble plus fréquente chez les patients dont les décomptes de lymphocytes T CD4+ circulants se situent entre 200 et 500 cellules/ μ L de sang, soit en phase précoce de SIDA (Leigh, Shetty et al. 2004).



Figure 4 : La candidose érythémateuse

Les candidoses pseudo-membranaire et érythémateuse représentent les deux types de COP les plus fréquemment associés à l'infection au VIH-1 (1993). Elles se manifestent sensiblement par les mêmes symptômes, soient une sensation de brûlure et la difficulté à ingérer autant les liquides que les solides. Cependant, elles se distinguent par la nature et l'intensité de la réponse immunitaire induite. La candidose érythémateuse se caractérise par de nombreux abcès composés de polymorphonucléaires neutrophiles dans l'épithélium alors que ceux-ci sont rarement présents dans le cadre de la candidose pseudo-membranaire. Toutefois, un important recrutement de cellules mononuclées est observé dans ces deux types de candidoses (Reichart, Philipsen et al. 1995; Eversole, Reichart et al. 1997).

La perlèche

La perlèche, ou chéilite angulaire, fréquemment associée à la stomatite, est également diagnostiquée chez les patients infectés au VIH. Elle se présente sous forme de fissures et de rougeurs diffuses à la commissure des lèvres. Bien que cette infection soit fortement associée à la malnutrition, principalement aux déficiences en fer et en vitamine B12 (Farah, Ashman et al. 2000), elle est significativement associée à l'infection au VIH-1. Elle est plus particulièrement fréquente en présence de candidose pseudo-membranaire (Adurogbangba, Aderinokun et al. 2004).

La candidose hyperplasique chronique

La candidose hyperplasique chronique est moins fréquemment associée à l'infection au VIH. Elle est caractérisée par l'apparition de plaques blanches localisées à la muqueuse buccale et à la commissure des lèvres. Contrairement aux plaques observée lors de candidose pseudo-membranaire, celles-ci ne peuvent être délogées (Dodd, Greenspan et al. 1991). Tout comme la chéilite angulaire, cette forme de candidose est souvent associée à la malnutrition. Sans traitement approprié, une faible proportion des lésions peut évoluer en carcinomes (Sitheequ and Samaranayake 2003).

La candidose œsophagienne

La candidose œsophagienne est une complication fréquente de la COP et survient chez près de 75% des patients infectés au VIH présentant une candidose oropharyngée. Le diagnostic nécessite une biopsie effectuée au cours d'un examen endoscopique (Reef and Mayer 1995). Bien que souvent asymptomatique, cette forme de candidose s'accompagne généralement de dysphagie (difficulté à déglutir) et d'odynophagie (douleur à la déglutition). Il devient alors difficile pour ces patients de se nourrir convenablement, ce qui cause une importante perte de poids et un affaiblissement de leur état général (Tavitian, Raufman et al. 1986).

Tel que mentionné précédemment, l'utilisation des HAARTs a causé une régression importante de la prévalence de la COP ainsi que de la charge buccale de

C. albicans chez les patients infectés au VIH (de Rentigny, Lewandowski et al. 2004). Cet impact considérable des HAARTs est imputé à la reconstitution immunitaire qu'ils induisent par l'augmentation des décomptes de lymphocytes T CD4+. Il a toutefois été démontré que cette augmentation, bien que nécessaire, est insuffisante à protéger les individus infectés (Yang, Lo et al. 2006). La reconstitution immunitaire n'est pas seule responsable de la diminution de la prévalence de la COP. La diminution de la charge virale et l'action directe exercée par les inhibiteurs de protéase sur les Saps de *C. albicans* semblent également participer à ce phénomène (de Rentigny, Lewandowski et al. 2004).

2.3 Virus de l'immunodéficience humaine

2.3.1 Épidémiologie et transmission

Le VIH est un rétrovirus membre de la famille des lentivirus, identifié en 1983 comme étant l'agent étiologique du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) (Barre-Sinoussi, Chermann et al. 1983; Gallo, Salahuddin et al. 1984). Depuis la première description du SIDA en 1981, la pandémie s'est rapidement propagée à la surface du globe. En 2007, l'ONUSIDA estimait à 33 millions le nombre de personnes infectées au VIH, dont 2.7 millions nouvellement infectées. Toujours en 2007, le nombre de décès associés au virus était estimé à 2 millions et 38% d'entre eux survenait en Afrique sub-saharienne. Cette région est particulièrement touchée par la pandémie; elle abritait 67% des personnes vivants avec le VIH cette même année (ONUSIDA 2008).

Le VIH est généralement transmis lors de relations sexuelles non protégées, de partage de matériel associé à l'utilisation de drogues injectables ou par transmission mère-enfant durant la grossesse, au cours de l'accouchement ou de l'allaitement. Le traitement des mères infectées a toutefois permis de réduire la fréquence de la transmission *in utero* intra-partum et péri-partum de 30% à 2%. La transmission via l'allaitement demeure cependant un problème majeur, principalement dans les pays en voie de développement (Watts 2002).

2.3.2. Pathogénèse

Le VIH cause une infection chronique dont la pathologie se développe au cours des dernières étapes de la maladie. La primo- infection survient 2 à 4 semaines suivant l'entrée du virus (Clark, Saag et al. 1991; Daar, Moudgil et al. 1991). Les symptômes sont peu spécifiques mais se présentent souvent sous forme de syndrome pseudo-grippal ou mononucléosique, bien que près de 50 % des personnes infectées soient asymptomatiques (Graziosi, Pantaleo et al. 1993; Lloyd 1996). La primo-infection est caractérisée par la réplication accrue du virus et la chute drastique du nombre de lymphocytes T CD4 circulants (Cooper, Gold et al. 1985; Daar, Moudgil et al. 1991; Henrard, Daar et al. 1995). Une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8 cytotoxiques est également observée chez la majorité des personnes infectées, suivie de la séroconversion. Une réponse immunitaire adaptative impliquant les lymphocytes T CD8 cytotoxiques ainsi que les lymphocytes B permet de limiter la virémie et d'augmenter le nombre de lymphocytes T CD4 circulants (Borrow, Lewicki et al. 1994; Koup, Safrit et al. 1994). Cette réponse immunitaire permet l'établissement d'une période de latence débutant normalement 9 à 12 semaines suivant l'infection initiale et pouvant se maintenir une dizaine d'années (Fauci 1993). Cette période est caractérisée par la réplication soutenue du virus et le déclin graduel du nombre et des fonctions des lymphocytes T CD4. Les signes cliniques du SIDA apparaissent finalement lorsque les décomptes de lymphocytes T CD4 circulants se situent sous les 200 cellules/mm³ de sang (Poli, Pantaleo et al. 1993). À ce stade, les patients sont susceptibles à de nombreuses infections opportunistes (tuberculose, infections herpétiques, candidoses, toxoplasmose), au développement de tumeurs (sarcome de Kaposi et lymphome non hodgkinien) et à certains désordres neurologiques (Lloyd 1996). En présence ou en absence de thérapie adéquate, la maladie se solde inexorablement par le décès.

2.3.3. Tropisme

L'entrée du VIH à l'intérieur de ses cellules cibles nécessite la liaison de la gp120 au récepteur de surface CD4 puis la liaison de ce complexe à un corécepteur, les principaux étant les récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4 (Poveda, Briz et al. 2006). CCR5 est exprimé à la surface des cellules dendritiques, des monocytes/macrophages et des lymphocytes T CD4 alors que CXCR4 est exprimé à la surface des lymphocytes T activés. Les virus nécessitant la liaison à CCR5 sont identifiés comme étant des virus R5 et ceux nécessitant CXCR4 comme étant X4. Des virus double tropiques R5/X4 existent également (Berger, Doms et al. 1998). Les virus R5 semblent être transmis plus efficacement que les virus X4 et sont par conséquent considérés comme étant responsables de l'établissement de l'infection (Pope and Haase 2003). La progression de la phase asymptomatique à la phase SIDA est pour sa part associée à une transition du phénotype R5 vers X4 chez près de 50% des patients séropositifs (Connor, Sheridan et al. 1997).

Le VIH infecte les cellules dendritiques via CD4, CCR5 et DC-SIGN et ces cellules représentent un réservoir important du virus. Les DCs transportent le virus aux ganglions lymphatiques où elles provoquent l'activation des lymphocytes T CD4 qui acquièrent ainsi un phénotype de cellules T mémoires. Les lymphocytes T CD4 mémoires expriment de hauts niveaux de CCR5 et de CXCR4 et représentent les principaux producteurs de virus *in vivo*. Parmi les réservoirs du virus chez l'homme, notons les cellules dendritiques, les macrophages, les lymphocytes T CD4 et les cellules microgliales du système nerveux central (Alexaki, Liu et al. 2008).

2.3.4 Structure, gènes et fonctions

Le VIH est composé d'une enveloppe formée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées les glycoprotéines gp120 et gp41 ainsi qu'un certain nombre de protéines dérivées des cellules infectées. La portion interne de l'enveloppe est aussi composée de protéines formant la matrice. La nucléocapside contient le génome viral

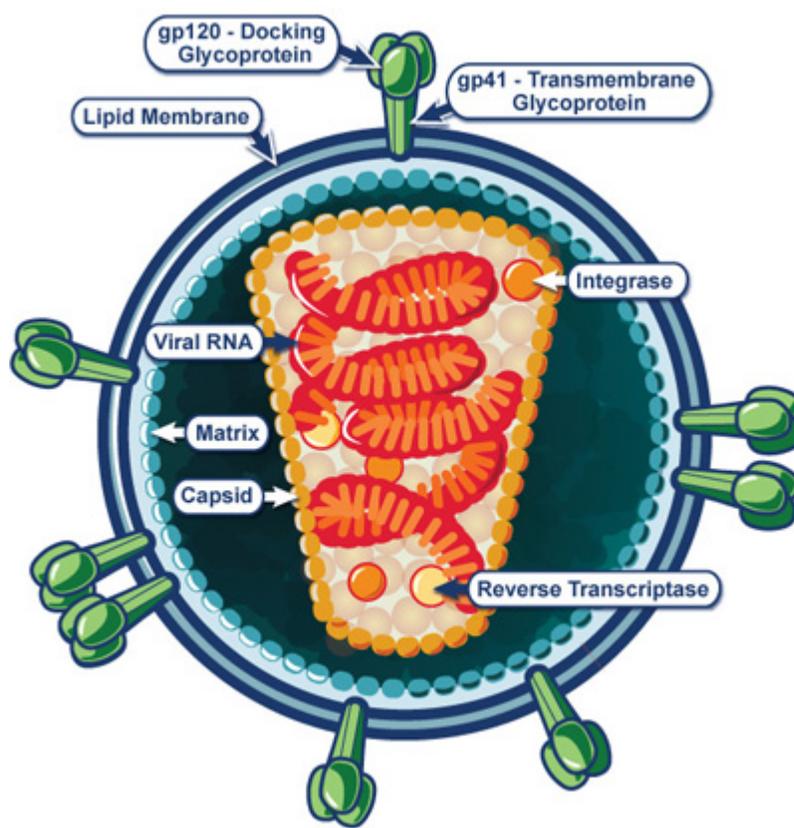


Figure 5: Le virus de l'immunodéficience humaine (tiré de NIAID <http://www3.niaid.nih.gov>)

ainsi que la protéase, la transcriptase inverse et l'intégrase; ces trois enzymes sont nécessaires aux étapes précoces du cycle de réplication viral (Krogstad 2003) (figure 5).

Le génome du VIH est composé de 2 copies d'ARN simple brin à polarité positive de 9.2 Kb. Il consiste en 9 gènes compris entre de longues séquences répétitives terminales (LTRs) nécessaires à l'intégration du provirus. Les gènes *gag*, *pol* et *env* représentent les gènes majeurs du VIH et encodent respectivement les protéines structurales de l'enveloppe virale (capside, nucléocapside et matrice), les enzymes nécessaires à la réplication virale (protéase, transcriptase inverse et intégrase) et les glycoprotéines de l'enveloppe (gp120 et gp41) responsables de l'entrée du virus dans la cellule hôte (Frankel and Young 1998). Les gènes *tat* et *rev* sont pour leur part considérés comme étant des gènes régulateurs, le premier

augmente l'élongation du transcrit viral et le second permet l'exportation des ARNs viraux hors du noyau (Jones and Peterlin 1994; Hope 1997). Le VIH possède également un certain nombre de gènes accessoires (*vpu*, *vif*, *vpr* et *nef*) nécessaires à la réplication et à la pathogénicité du virus *in vivo*. Le gène *vpu* est responsable de la dégradation de CD4 à l'intérieur des cellules infectées et est nécessaire au relargage des virions alors que le gène *vif* contribue au pouvoir infectieux du virus (Cohen, Subbramanian et al. 1996; Simon and Malim 1996; Lamb and Pinto 1997). Pour sa part, *vpr* facilite le transport au noyau de l'ADN viral double brin, facilite l'infection des macrophages et est aussi responsable de l'arrêt du cycle cellulaire en phase G2 (Cohen, Subbramanian et al. 1996; Emerman 1996; Krogstad 2003). Finalement, le gène *nef* est responsable de la réduction de l'expression du CD4, du CMH-I et du CMH-II à la surface des cellules hôtes, de l'augmentation de l'apoptose des cellules infectées, de l'infectiosité des virions et de l'état d'activation cellulaire (Benichou, Liu et al. 1997; Le Gall, Heard et al. 1997; Mangasarian and Trono 1997).

2.3.5 Perturbations des mécanismes de protection envers *C. albicans* induites par le VIH

Immunité humorale

Les IgA sécrétoires constituent la première ligne de défense contre les pathogènes présents au niveau des muqueuses (Marcotte and Lavoie 1998). Cependant, une déplétion importante des IgA2 est observée au cours de l'infection au VIH et il semble que cette déplétion atteigne tous les isotypes d'IgA en phase SIDA (Challacombe and Naglik 2006). Bien que la sécrétion d'IgA augmente chez les patients atteints de COP (Epstein, Kimura et al. 1982) et que la production d'anticorps spécifiques à *C. albicans* soit corrélée à l'augmentation de la charge buccale du pathogène chez des patients séropositifs, il est possible que cette production d'anticorps soit le résultat de l'infection plutôt que de la protection à l'égard du pathogène (Coogan, Sweet et al. 1994). À ce jour, aucune étude n'a permis

d'impliquer une déficience de l'immunité humorale dans l'augmentation de la prévalence de la COP chez les patients séropositifs (Fidel 2006).

Immunité à médiation cellulaire

Les kératinocytes

Les kératinocytes peuvent être infectés par le VIH-1 bien qu'ils n'expriment pas le CD4. L'attachement du virus à la surface de ces cellules s'effectue via un glycolipide, la galactosylcéramide (GalCer), et le CXCR4 (Challacombe and Naglik 2006). Une étude récente a démontré qu'une lignée de kératinocytes supporte l'intégration non-productive du VIH-1 et permet la transmission des virus X4 et R5 aux cellules mononuclées du sang périphérique par contact direct cellule à cellule (Vacharaksa, Asrani et al. 2008). Il semble toutefois que l'infection par le VIH n'altère en rien les propriétés anti-*Candida* des kératinocytes (Steele, Leigh et al. 2000).

Les lymphocytes T

Le nombre de lymphocytes T est drastiquement diminué dans la muqueuse buccale des patients infectés au VIH-1, en présence ou en absence de COP (Steidley, Thompson et al. 1992; Odden, Schenck et al. 1995; Romagnoli, Pimpinelli et al. 1997). Tel que mentionné précédemment, le rôle des lymphocytes T CD4 dans la protection contre cette infection est suggéré par la corrélation directe établie entre la déplétion de ces lymphocytes et l'incidence de la COP (Fidel 2002). L'infection au VIH induit une transition du phénotype Th1 vers Th2 ainsi qu'une diminution des lymphocytes Th17 (Ndhlovu, Chapman et al. 2008). Les lymphocytes T régulateurs participent à la déplétion des lymphocytes T CD4 et CD8 au cours de l'infection au VIH. La liaison du virus aux Trégs augmente leur activité suppressive et leur survie et conduit à leur accumulation aux tissus lymphoïdes et aux muqueuses (Ji and Cloyd 2009). L'infection au VIH-1 augmente également le nombre de lymphocytes T régulateurs (Bi, Suzuki et al. 2009; Cao, Jamieson et al. 2009). Finalement, il semble

que les fonctions des lymphocytes T CD4 soient également diminuées par la déplétion et l'altération de la présentation antigénique par les DCs (Lewandowski, Marquis et al. 2006).

Les lymphocytes T CD8 sont progressivement diminués suite à l'infection au VIH-1. Cette diminution survient en partie via l'apoptose médiée par les macrophages (Herbein, Mahlknecht et al. 1998). Néanmoins, les lymphocytes T CD8 s'accumulent à la membrane basale de la muqueuse buccale chez les patients séropositifs présentant une COP, démontrant ainsi que leur recrutement n'est pas compromis par l'infection au VIH (Romagnoli, Pimpinelli et al. 1997; Myers, Leigh et al. 2003). L'augmentation de la charge buccale de *C. albicans* chez une souris transgénique exprimant le génome tronqué du VIH-1 et porteuse d'un «*knockout*» T CD8 a également permis de démontrer l'importance de ces cellules dans la défense contre la COP (Marquis, Lewandowski et al. 2006).

Cellules effectrices

Les cellules de Langerhans

Le VIH utilise les DCs comme un véhicule lui permettant d'atteindre les lymphocytes T CD4 localisés aux muqueuses ou aux ganglions lymphatiques. Le virus possède également la capacité d'infecter directement les DCs et les LCs et de s'y répliquer pour ensuite perturber la transduction de signal et de ce fait perturber la sécrétion de cytokines antivirales et inflammatoires nécessaires au développement d'une réponse immunitaire protectrice (Cavrois, Neidleman et al. 2008).

Plusieurs études ont démontré que l'infection au VIH induit des perturbations des LCs retrouvées à la muqueuse buccale, dont un défaut de maturation (Pimpinelli, Borgognoni et al. 1991; Romagnoli, Pimpinelli et al. 1997) et une diminution de la capacité à présenter les antigènes autre que le virus lui-même (Knight and Patterson 1997). La déplétion des LCs est également observée chez les patients infectés au VIH et survient simultanément à l'apparition de lésions fongiques à la cavité orale (Chou, Epstein et al. 2000). La réduction du nombre et des fonctions des DCs peut être

imputée à la stimulation que ces dernières induisent sur les lymphocytes T cytotoxiques suite à l'exposition au VIH (Chou, Epstein et al. 2000) ainsi qu'à la diminution de l'expression de surface du CMH-I et du CMH-II, également induite par le virus (Pimpinelli, Borgognoni et al. 1991; Romagnoli, Pimpinelli et al. 1997). Finalement, le nombre et les fonctions des DCs sont aussi diminués chez des souris transgéniques exprimant le génome tronqué du VIH-1. Ces DCs présentent un phénotype immature (Lewandowski, Marquis et al. 2006) ainsi qu'un défaut de présentation antigénique *in vitro* (Poudrier, Weng et al. 2003), suggérant que la reconnaissance et l'apprêtement des antigènes de *C. albicans* pourraient être altérés chez ces souris.

Les polymorphonucléaires (PMNs)

Les polymorphonucléaires neutrophiles ne sont pas infectés par le VIH et leur recrutement au site de la candidose est conservé chez les patients séropositifs présentant une COP (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). La capacité des polymorphonucléaires neutrophiles à inhiber la croissance de la forme levure de *C. albicans* est également préservée chez les patients infectés au VIH, alors que leurs fonctions phagocytaires et fongicides ont été évaluées comme étant inchangées, diminuées ou augmentées chez ces mêmes patients (Ellis, Gupta et al. 1988; Ryder, Winkler et al. 1988; Bandres, Trial et al. 1993; Wenisch, Parschalk et al. 1996; Munoz, Salmen et al. 1999; Mastroianni, d'Ettoire et al. 2000). Cependant, il a été démontré chez des souris transgéniques exprimant une portion du génome du VIH-1 que les capacités des PMNs à phagocyter et tuer *C. albicans* sont inaltérées et que cette population cellulaire n'est pas nécessaire au confinement de *Candida* à la muqueuse buccale (Marquis, Lewandowski et al. 2006).

Les macrophages

Les macrophages constituent un réservoir et un vecteur important de transmission du VIH pouvant propager le virus à tous les tissus et organes du corps, dont le cerveau (Carter and Ehrlich 2008). Contrairement aux cellules dendritiques et aux lymphocytes T, les macrophages ne sont pas déplétés par l'infection au VIH en

raison du contrôle exercé par le virus sur les voies transcriptionnelles de ces cellules. Ce contrôle conduit à l'inhibition de l'apoptose et transforme les macrophages en un réservoir du virus favorisant la réplication virale. Une étude récente a permis de démontrer l'importance de ce rôle de réservoir à l'aide de souris atteintes du syndrome de l'immunodéficience acquise murine (MAIDS). Ces souris ont été traitées à l'azidothymidine (AZT) et à la didéoxyinosine (DDI), puis déplétées en macrophages. Chez les souris déplétées, la recrudescence de la virémie suite à l'arrêt de traitement s'est vue retardée par rapport aux groupes contrôles, démontrant l'implication des macrophages dans ce phénomène (Serafini, Fraternali et al. 2009).

L'infection au VIH induit de nombreuses perturbations fonctionnelles chez les macrophages. Un défaut de recrutement de leurs précurseurs (monocytes du sang périphérique) aux sites d'inflammation en réponse à certaines chimiokines a été démontré chez des patients séropositifs (Wahl, Allen et al. 1989). La modulation de la production de cytokines inflammatoires, anti-inflammatoires et régulatrices par les macrophages a aussi été observée (Kedzierska and Crowe 2001). Différentes propriétés candidicides sont également perturbées par l'infection au VIH. La capacité des macrophages de patients séropositifs à phagocyter *C. albicans* est diminuée (Crowe, Vardaxis et al. 1994) ainsi que la phagocytose médiée par le récepteur du mannose (MMR), dont l'expression est réduite dans le contexte de l'infection au VIH (Fraser, Koziel et al. 1998; Porcheray, Samah et al. 2006). L'activité fongicide des macrophages est aussi altérée par le virus (Baldwin, Fleischmann et al. 1990; Crowe 1995). Il a été démontré que Nef module la production d'espèces réactives de l'oxygène de façon biphasique et que cette modulation implique la phosphorylation de p47^{phox} par Nef (Olivetta, Pietraforte et al. 2005; Olivetta, Mallozzi et al. 2009). Finalement, il semble que la coinfection des macrophages par un pathogène opportuniste augmente la réplication virale (Orenstein, Fox et al. 1997).

La protéine virale Nef joue un rôle crucial dans l'établissement des perturbations fonctionnelles des macrophages en activant spécifiquement différentes voies de signalisation. Nef active le facteur de transcription NF- κ B, induisant ainsi la transcription et la sécrétion de MIP-1 α , de MIP-1 β , d'IL-1 β , d'IL-6 et de TNF- α par

les macrophages (Olivetta, Percario et al. 2003). La sécrétion de MIP-1 α , d'IL-6 ainsi que d'autres facteurs solubles active spécifiquement STAT3 (Percario, Olivetta et al. 2003) ce qui contribue à l'inhibition de l'apoptose et donc à la survie du virus à l'intérieur des macrophages. Nef active également STAT1 via la sécrétion de différents facteurs solubles (Federico, Percario et al. 2001) et module la signalisation via la voie des *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) (Mangino, Percario et al. 2007). Nef interagit aussi avec des protéines de la famille des sérine/thréonine kinases, dont la *p21 activated kinase* PAK2 (Vincent, Priceputu et al. 2006), ce qui pourrait affecter la régulation du cycle cellulaire, l'inhibition de l'apoptose et la différenciation des macrophages (Vazquez, Greenwell-Wild et al. 2005). Finalement, Nef réduit la relâche de TNF- α par les macrophages suite à la reconnaissance de pathogènes via le TLR4 en perturbant la régulation de ERK1/2 (Tachado, Zhang et al. 2005).

Chapitre 3 : Les modèles murins de la candidose

L'utilisation de modèle animal est nécessaire à l'amélioration de nos connaissances de la pathogénèse de la candidose et des facteurs favorisant l'établissement de l'infection à différents sites anatomiques. La souris est largement utilisée comme modèle d'étude de la candidose en raison de sa petite taille, de la disponibilité de réactifs et de méthodes d'analyses immunologiques spécifiques ainsi que de la possibilité de générer des animaux transgéniques permettant de reproduire les perturbations immunitaires rencontrées chez les patients atteints de candidose (de Repentigny 2004).

La majorité des modèles murins de la candidose développés et validés au cours des dernières années concernent l'infection des muqueuses ou l'infection systémique (de Repentigny 2004). Les différents modèles murins ayant permis d'améliorer notre compréhension des mécanismes impliqués dans la pathogénèse de la candidose sont brièvement décrits ci-dessous.

3.1 Souris et immunosuppresseurs

Peu de modèles murins permettent l'établissement d'une colonisation persistante à *C. albicans* puisque la souris n'est pas naturellement colonisée par ce champignon, contrairement à l'humain qui le devient peu après la naissance. Le modèle de la souris-enfant fait cependant exception. L'inoculation oro-gastrique de *C. albicans* à des souriceaux âgés de 4 à 6 jours permet la colonisation persistante au niveau du tractus gastro-intestinal et conduit au développement d'une candidose gastro-intestinale et systémique (Guentzel and Herrera 1982; de Repentigny, Phaneuf et al. 1992). Ce modèle permet l'étude de l'effet de divers agents immunosuppresseurs dont l'utilisation est reconnue comme étant un facteur prédisposant à la candidose (Guentzel and Herrera 1982). Plusieurs de ces agents, dont les glucocorticoïdes (Deslauriers, Coulombe et al. 1995; Kamai, Kubota et al. 2001; Kamai, Kubota et al. 2002) ou la cyclophosphamide (Guentzel and Herrera 1982; de Repentigny, Phaneuf et al. 1992; Netea, van Der Meer et al. 1999) sont

d'ailleurs utilisés afin de permettre l'établissement d'une colonisation au niveau de l'oropharynx (Kamai, Kubota et al. 2001; Kamai, Kubota et al. 2002), du tractus gastro-intestinal (Guentzel and Herrera 1982) ou encore une infection systémique à partir de l'estomac (Guentzel and Herrera 1982; de Repentigny, Phaneuf et al. 1992; Netea, van Der Meer et al. 1999) chez des souris adultes. L'irradiation est également utilisée (Farah, Elahi et al. 2001; Farah, Hong et al. 2001; Bacci, Montagnoli et al. 2002; Mencacci, Montagnoli et al. 2002) afin de favoriser la colonisation des mêmes sites et est souvent combinée à la transplantation de cellules hématopoïétiques déplétées en cellules à l'étude (Mencacci, Perruccio et al. 2001; Bacci, Montagnoli et al. 2002; Mencacci, Montagnoli et al. 2002) ou à la neutralisation des cellules à l'étude à l'aide d'anticorps monoclonaux (Farah, Elahi et al. 2001).

3.2 Souris atteintes d'immunodéficiences congénitales

Puisque des altérations de l'immunité sont souvent nécessaires à l'établissement d'une infection chronique à *C. albicans*, la disponibilité de modèles murins présentant des immunodéficiences congénitales s'est avérée fort utile dans l'approfondissement de nos connaissances de la pathogénèse de la candidose. La souris SCID, qui présente une altération du nombre et des fonctions des lymphocytes B et T a été largement utilisée afin de déterminer le rôle joué par ces cellules dans la défense contre l'infection des muqueuses par *Candida* (Jensen, Warner et al. 1993; Jensen, Warner et al. 1994; Samaranayake and Samaranayake 2001; Bromuro, Torosantucci et al. 2002). La souris nue (nu/nu) est athymique et présente par conséquent une altération du nombre et des fonctions des lymphocytes T. Ces souris développent une candidose oropharyngée chronique suite à l'inoculation orale de *C. albicans* (Farah, Elahi et al. 2002). Les souris beiges (bg/bg) présentent un défaut des lysosomes causant une altération des fonctions des phagocytes et des cellules NK et développent un état de porteur chronique suite à l'inoculation orale de *C. albicans* (Samaranayake and Samaranayake 2001). Plusieurs groupes ont tiré profit de ces deux derniers modèles murins pour en créer un seul. La souris bg/bg nu/nu est colonisée au niveau de la muqueuse buccale et du tractus gastro-intestinal et

développe une candidose disséminée d'origine endogène causant le décès de 30% des animaux en moins de 4 semaines (Cantorna and Balish 1990).

3.3 Souris Knockout

L'étude du rôle spécifique de certaines composantes du système immunitaire en réponse à la candidose est facilitée par l'utilisation de souris « *knockout* ». Plusieurs de ces lignées de souris sont déplétées en certaines populations cellulaires, par exemple en lymphocytes T CD4, en lymphocytes T $\gamma\delta$ ou en lymphocytes B (Wagner, Vazquez-Torres et al. 1996; Wormley, Steele et al. 2001; Wormley, Cutright et al. 2003) et ont permis d'identifier le rôle de ces populations cellulaires dans la protection envers la vaginite et la candidose systémique, respectivement. D'autres lignées sont déplétées en cytokines, telles l'IL-12, l'IL-4, l'IL-6 ou encore l'IL-18 (van Enkevort, Netea et al. 1999; d'Ostiani, Del Sero et al. 2000; Netea, Vonk et al. 2003). Ces animaux « *knockout* » nous renseignent sur l'implication de ces cytokines et des mécanismes qu'elles engendrent dans la pathogénèse de la candidose. Finalement, l'expression de certains récepteurs de surface est déficiente chez d'autres lignées de souris. Ceci permet la déplétion de certaines populations cellulaires (Jones-Carson, Vazquez-Torres et al. 2000), l'étude du rôle de ces récepteurs dans la protection contre la candidose et permet également d'identifier les mécanismes sous-tendant cette protection (Netea, Van Der Graaf et al. 2002). Les lignées de souris « *knockout* » présentent toutefois certaines limites, la principale étant que les fonctions d'un seul constituant de l'immunité impliqué dans la protection contre la candidose peuvent être sous-estimés par l'existence de mécanismes intacts et redondants compensant les fonctions étudiées (de Repentigny 2004).

3.4 Souris transgéniques exprimant le génome du VIH

Le premier modèle murin ayant permis l'étude de la COP dans le contexte de l'infection au VIH est celui de la souris MAIDS. Suite à l'inoculation intra-orale de *C. albicans*, des souris C57BL/6 ont été infectées avec une mixture de virus murins isolée d'une radioleucémie et contenant le virus non-pathologique G₆T₂ et l'agent pathologique responsable du MAIDS, le virus de la leucémie murine Du5H dont la réplication est déficiente et qui encode une seule protéine, la Pr60^{gag} (Deslauriers, Cote et al. 1997; De Leval, Debrus et al. 1999). Cette protéine induit le MAIDS, qui reproduit certaines pathologies associées à l'infection au VIH-1 dont une lymphadénopathie, une splénomégalie, l'activation polyclonale des lymphocytes B et une altération de la prolifération des lymphocytes T CD4 (Deslauriers, Cote et al. 1997). Ces souris ont également développé un phénotype de porteur chronique au niveau de la cavité buccale suite à l'infection orale au *C. albicans* et 30 % des animaux ont subi des épisodes récurrents de COP. Bien que ce modèle reproduise partiellement plusieurs pathologies associées au VIH-1, la déplétion progressive des lymphocytes T CD4 ne survient pas, ce qui limite l'utilisation de ce modèle à l'étude de la phase précoce de l'infection (Deslauriers, Cote et al. 1997).

3.4.1 La souris CD4C/HIV^{MutA}

3.4.1.1. Expression du transgène

Aujourd'hui, un modèle murin reproduisant plus fidèlement la pathologie de l'infection au VIH-1 permet l'étude de la COP dans le contexte de cette infection. La souris transgénique CD4C/HIV^{MutA} exprime les gènes *rev*, *env* et *nef* intacts alors que tous les autres (*gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *tat* et *vpu*) sont mutés. Le transgène est exprimé sous contrôle d'un *enhancer* murin CD4 et d'un promoteur humain CD4C, ce qui limite l'expression du transgène aux thymocytes CD4⁺ CD8⁺ immatures, aux lymphocytes T CD4⁺ et aux cellules de lignées myéloïdes telles que les macrophages et les cellules dendritiques, ce qui représente les populations cellulaires infectées chez les patients séropositifs (Hanna, Kay et al. 1998). L'utilisation du promoteur

CD4C humain est essentielle à l'expression du transgène par les cellules dendritiques et les macrophages puisque le promoteur CD4C murin n'est pas exprimé par la plupart des cellules de lignée myéloïde, tels les macrophages. Ces souris CD4C/HIV^{MutA} ainsi que les différentes lignées génétiques (figure 6) sont générées au laboratoire du Dr Paul Jolicoeur à l'Institut de recherches cliniques de Montréal.

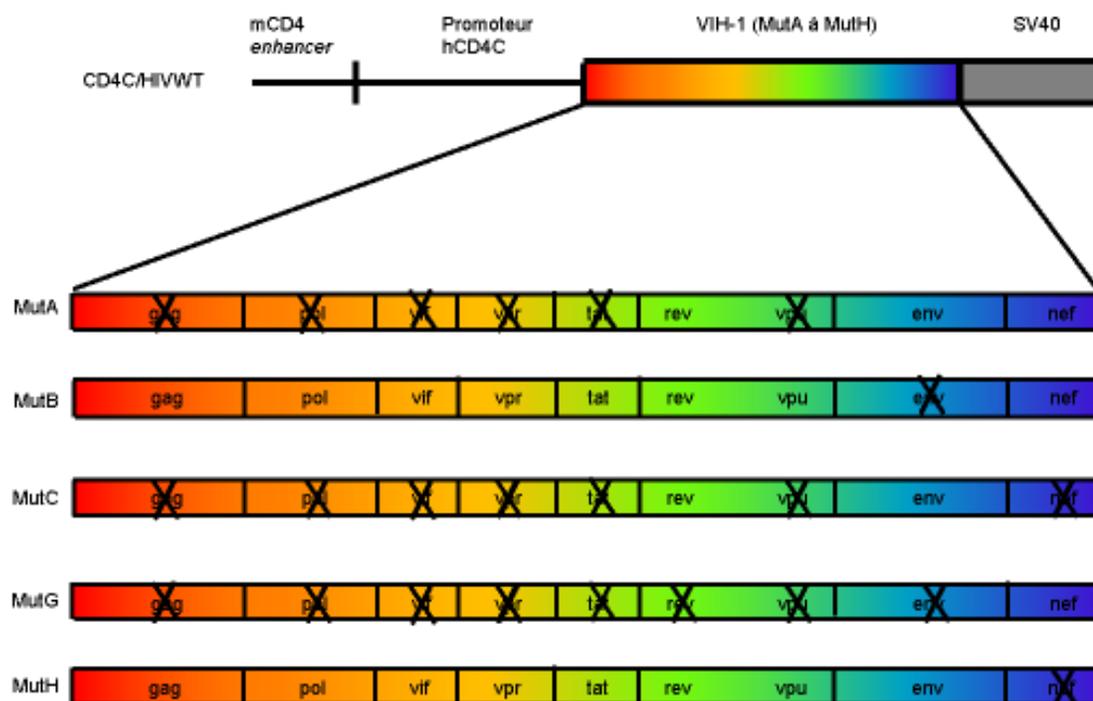


Figure 6 : Structure du transgène CD4C/HIV^{Mut}. L'enhancer CD4 murin, le promoteur CD4 humain, chacun des génomes mutés du VIH-1 et la séquence de polyadénylation du virus simien SV40 ont été liés. (Inspiré de Hanna, Kay & al, 1998).

3.4.1.2. Sévérité de la pathologie et phénotype de porteur chronique de *C. albicans*

La souris CD4C/HIV^{MutA} développe une maladie similaire au SIDA. Les symptômes apparaissent entre 30 jours et 16 mois de vie (de Repentigny, Aumont et al. 2002) et consistent en une importante perte de poids, le développement d'une néphrite tubulo-interstitielle et d'une pneumonite interstitielle, l'atrophie et la fibrose des organes lymphoïdes, la déplétion des lymphocytes T CD4 et la mort prématurée. La sévérité de la maladie est toujours corrélée au niveau d'expression du transgène (Hanna, Kay et al. 1998).

Ces souris développent également un état de porteur chronique suite à l'inoculation orale de *C. albicans*. Quatre jours suivant l'inoculation, une primo-infection fulgurante caractérisée par des décomptes buccaux très élevés de *Candida* est observée, et suivie d'un état de porteur chronique qui est maintenu pour une période de 6 à 10 semaines. Une recrudescence de la croissance du champignon précède la mort et est parfois accompagnée de placards blancs à la surface dorsale de la langue. L'œsophage, l'estomac, le petit et le gros intestin sont également colonisés (de Repentigny, Aumont et al. 2002).

3.4.2 Souris CD4C/HIV^{MutG}

La souris CD4C/HIV^{MutG} exprime uniquement le gène *nef* intact et le transgène est construit tel que décrit précédemment. Puisque ces animaux développent aussi une maladie semblable au SIDA, le gène *nef* est nécessaire et suffisant à l'apparition du phénotype observé. Comme pour la souris CD4C/HIV^{MutA}, la sévérité de la pathologie est corrélée au niveau d'expression du transgène (Hanna, Kay et al. 1998).

La souris CD4C/HIV^{MutG} présente un phénotype de porteur chronique de *C. albicans* semblable à celui observé chez la souris CD4C/HIV^{MutA}. Ceci démontre que *nef* est aussi nécessaire et suffisant à l'infection persistante à *C. albicans* (Marquis, Lewandowski et al. 2006).

3.4.3 Souris CD4C/HIV^{MutG} iNOS KO

La souris CD4C/HIV^{MutG} iNOS KO provient d'un croisement entre des souris homozygotes *NOS2*^{-/-} provenant du laboratoire du Dr. Foo Y. Liew de l'Université de Glasgow (Wei, Charles et al. 1995) et des souris CD4C/HIV^{MutG} provenant du laboratoire du Dr. Paul Jolicoeur et décrites précédemment. Les souris *NOS2*^{-/-} sont viables, fertiles et ne présentent aucune anomalie histopathologique particulière. Les souris homozygotes sont cependant susceptibles à l'infection à *Leishmania major* alors que les souris hétérozygotes y sont résistantes. Ce modèle murin permet l'étude du rôle de iNOS dans la protection contre différentes infections (Wei, Charles et al. 1995). Les souris CD4C/HIV^{MutG} iNOS homozygotes et hétérozygotes ainsi générées permettent l'étude du rôle de l'enzyme iNOS envers *C. albicans* dans un contexte mimant l'infection au VIH-1.

RAISONNEMENT ET HYPOTHÈSE :

Sachant que :

- i) La candidose oropharyngée est une infection opportuniste affligeant particulièrement les patients infectés au VIH-1;
- ii) Les manifestations cliniques de la COP surviennent simultanément à la perte de fonctions du système immunitaire et à la diminution du nombre de lymphocytes T CD4;
- iii) Une souris transgénique reproduisant les altérations du système immunitaire induites par l'infection au VIH-1 ainsi que la pathologie associée à la progression de la maladie vers la phase SIDA est disponible;
- iv) Un défaut des phagocytes est nécessaire à la dissémination du champignon chez la souris SCID;
- v) Les polymorphonucléaires neutrophiles ne sont pas nécessaires au confinement de *C. albicans* au niveau des muqueuses chez la souris transgénique exprimant le génome tronqué du VIH-1;

Nous proposons l'hypothèse selon laquelle, chez ce modèle murin :

- i) Les macrophages limitent la prolifération de *C. albicans* au niveau de la cavité buccale et de l'œsophage;
- ii) Les macrophages participent au confinement de *C. albicans* au niveau des muqueuses et empêchent la dissémination du champignon aux organes profonds;
- iii) La production de NO par les macrophages via la monoxyde d'azote synthase inductible (iNOS) participe à ces deux phénomènes.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Modèle murin de la candidose

Souris Tg

Une colonie de souris CD4C/HIV^{MutA} est maintenue à l'animalerie de l'Université de Montréal. Les souris Tg et les témoins non-Tg, mâles et femelles, sont certifiés exempts de pathogènes spécifiques et hébergés en micro-isolation, dans un environnement stérile. Les mâles exprimant le transgène peuvent servir en tant que reproducteurs. Ils sont alors placés en cage avec deux jeunes femelles C3H (Harlan) non-Tg. Le typage des souriceaux est ensuite réalisé par réaction en chaîne par polymérase (PCR) à l'aide d'oligonucléotides spécifiques au transgène. Les animaux sous protocole d'infection orale à *C. albicans* sont hébergés séparément des animaux témoins non-Tg afin d'éviter toute contamination fongique croisée par coprophagie.

Lorsque d'autres lignées transgéniques générées au laboratoire du Dr Jolicoeur sont étudiées, ces animaux sont hébergés à la quarantaine de l'animalerie de l'Université de Montréal. Des bilans de santé sont effectués pour chacun des animaux ainsi qu'un prélèvement au niveau de la gorge afin de déterminer si ces derniers sont porteurs de virus, de parasites ou de bactéries. Des souris homozygotes pour l'absence d'expression de l'enzyme *NOS2* ont été obtenues du laboratoire du Dr Foo Y. Liew de l'Université de Glasgow. Ces souris ont été croisées pour au moins 6 générations sur fond génétique C3H puis croisées avec des souris CD4C/HIV^{MutG} afin de générer une lignée de souris CD4C/HIV^{MutG} *iNOS knockout*.

Infection orale à *C. albicans*

La souche LAM-1 de *C. albicans*, isolée du sang d'un patient atteint de candidose systémique (Lacasse, Fortier et al. 1990), est conservée à -80°C. Une bouclée est prélevée quelques jours avant l'infection des différents groupes de souris afin d'ensemencer une gélose Sabouraud-dextrose, ensuite incubée à 37°C pour une période de 24 h puis conservée à 4°C jusqu'à utilisation. Une bouclée de *C. albicans* LAM-1 est prélevée de cette gélose 24 h précédant l'infection des souris puis mise en culture dans 5 mL de bouillon Sabouraud-dextrose. Afin d'obtenir des cellules en phase exponentielle de croissance, l'incubation se fait sous rotation pour une période de 18 heures à 30°C. Deux lavages sont ensuite effectués dans 5 mL de PBS avec centrifugations à $8000 \times g$ durant 9 minutes. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 2 mL de PBS puis une série de dilutions est effectuée pour décompte à l'hémacytomètre. Une quantité de 1×10^8 cellules viables par souris est nécessaire à l'établissement de l'infection. Le volume nécessaire à l'obtention de ce nombre de cellules est calculé et réparti dans des tubes Eppendorf. Ces tubes Eppendorf sont ensuite centrifugés à $16\,000 \times g$ pendant 5 minutes afin de culotter les levures puis le surnageant est retiré à l'aide d'une pipette Pasteur amincie. L'inoculum est alors prêt à être appliqué.

L'infection des souris est effectuée sous hotte biologique à l'animalerie afin de prévenir tout risque de contamination des animaux transgéniques. Une anesthésie générale légère est pratiquée afin de répartir *Candida* à la totalité de la muqueuse buccale et d'empêcher sa déglutition par l'animal. Les souris reçoivent 100 µL d'un mélange dilué de kétamine/xylazine (10 mg/mL et 1 mg/mL respectivement) par injection intrapéritonéale. Une fois les animaux endormis, l'inoculum de *C. albicans* est prélevé et appliqué à l'aide d'un écouvillon stérile à embout d'alginate de calcium (Calgiswab, Puritan) au niveau des joues, du palais dur et mou et de la face dorsale de la langue. Les souris sont ensuite replacées dans leur cage et observées deux heures plus tard afin de s'assurer que leur réveil se déroule sans complication.

Décompte des CFU buccaux

Des prélèvements buccaux sont effectués fréquemment suite à l'inoculation afin d'évaluer quantitativement le nombre de cellules de *C. albicans* ayant colonisé la muqueuse buccale. La semaine suivant l'inoculation, des prélèvements sont effectués quotidiennement sur chacun des individus infectés. Par la suite, les prélèvements sont effectués hebdomadairement. Pour ce faire, les souris sont maintenues en contention et les joues, le palais et la langue sont frottés à l'aide d'un écouvillon stérile à embout d'alginate de calcium (Calgiswab, Puritan). Ce dernier est ensuite plongé dans 2 mL de solution Ringer contenue dans une éprouvette stérile. Lorsque tous les prélèvements sont terminés, chaque tube est agité puis un volume préétabli (100 µL ou 200 µL) est ensemencé sur gélose Sabouraud-dextrose et incubé 24 heures à 37°C. Le décompte d'unités formatrices de colonies (CFU) est ensuite quantifié et la charge buccale de *C. albicans* est exprimée en nombre de CFUs par 2 mL de solution de Ringer. Au cours du suivi de l'infection, les animaux sont fréquemment examinés afin d'évaluer leur état de santé et l'apparition des points limites qui sont une perte de poids importante, la déshydratation, la difficulté à se déplacer, le dos voûté ainsi que le pelage hirsute. L'apparition de ces points limites annonce la dégradation de l'état de santé des animaux et exige leur euthanasie.

Décompte des CFU dans les organes

Les animaux sont euthanasiés lorsqu'ils présentent une combinaison de trois des points limites mentionnés précédemment, ou à une date prédéterminée. Avant l'euthanasie, un prélèvement buccal est effectué afin de quantifier les CFUs de *C. albicans* chez ces animaux. Les souris sont ensuite anesthésiées par injection sous-cutanée de 400 µL d'un mélange de kétamine/xylazine (10 mg/mL et 1 mg/mL respectivement) puis fixées solidement à une plaque de liège à l'aide d'aiguilles afin de procéder à la dissection sous hotte biologique afin de réduire au minimum les risques de contamination. Les instruments de dissection sont également désinfectés au Virkon 1% (Dispar) et à l'éthanol 100% puis flambés entre chacun des organes

disséqués. De nouveaux instruments sont aussi utilisés pour chaque animal. Après le prélèvement des organes, l'animal est euthanasié par dislocation cervicale.

Le foie, les reins, les poumons, l'estomac, le petit et le gros intestin et le cerveau sont prélevés en prenant soin de ne rien contaminer par le contenu du tractus gastro-intestinal. Chacun des organes est déposé sur un papier d'aluminium stérile, emballé afin de prévenir toute contamination puis pesé. Les organes sont ensuite broyés dans un mortier stérile auquel sont ajoutés de la poudre d'alundum et du PBS, ce qui facilite l'homogénéisation. Cet homogénat est ensuite transféré dans un tube stérile de 15 mL et le volume est ajusté à 5 mL à l'aide de PBS pour tous les organes à l'exception de l'estomac, du petit et du gros intestin pour lesquels le volume est ajusté à 8 mL. Un volume de 200 μ L est prélevé des homogénats de chacun des organes puisensemencé sur gélose Sabouraud-dextrose en duplicata, sauf pour l'estomac, le petit et le gros intestin pour lesquels le prélèvement est de 100 μ L et pour lesquels un prélèvement d'une dilution 10^{-1} de l'homogénat est également effectué. Ces géloses sont ensuite incubées à 37°C durant 24 heures et les décomptes de CFUs sont calculés puis exprimés en termes de CFU par gramme de tissu.

Des souris témoins non-Tg non-infectées sont également disséquées à la toute fin de l'expérimentation et leurs organesensemencés sur géloses Sabouraud-dextrose afin de vérifier qu'aucune contamination croisée ne soit survenue au cours de l'expérimentation.

Quantification de la production de NO par les macrophages péritonéaux

Récolte des macrophages d'exsudat péritonéal

Afin de favoriser le recrutement des macrophages à la cavité péritonéale, les souris subissent une injection de 1 mL de thioglycolate (0,36g/mL) par la voie intrapéritonéale. Trois jours plus tard, les cellules sont prélevées. Pour ce faire, les souris sont anesthésiées par injection sous-cutanée au niveau du cou avec 400-500 μ L d'un mélange de kétamine/xylazine (10 mg/mL et 1 mg/mL). Après l'anesthésie, l'animal

est fixé au comptoir de la hotte biologique et la peau de l'abdomen est dégagée à l'aide d'une lame de scalpel. Selon la grosseur de la souris, un volume de 5 à 8 mL de PBS froid stérile est injecté dans l'abdomen à l'aide d'une seringue de 10 mL munie d'une aiguille 21G. Afin de maximiser la récolte des cellules de la cavité péritonéale, l'abdomen est massé durant l'injection. En utilisant la même aiguille, le PBS injecté est aspiré puis déposé doucement dans un tube conique de 15 mL en prenant soin de retirer l'aiguille afin de préserver l'intégrité des cellules. Un volume de PBS froid équivalent à celui recueilli est ensuite injecté puis récolté de la même façon. Les mêmes manipulations sont effectuées pour chacune des souris et les prélèvements sont faits de façon individuelle.

Les cellules ainsi récoltées sont ensuite culottées par centrifugation à $200 \times g$ pendant 9 minutes, puis le surnageant est retiré. Les cellules sont ensuite resuspendues dans 500 μL de solution de lyse des érythrocytes (Annexe 1) puis centrifugées immédiatement à $200 \times g$ durant 9 minutes. Après avoir retiré le surnageant, les cellules provenant de souris individuelles sont mises en commun selon les groupes (Tg ou non-Tg) dans 5 mL de PBS, centrifugées de nouveau puis resuspendues dans 0,5 mL de RPMI supplémenté modifié (Annexe 1) par souris. Les cellules sont ensuite comptées à l'hémacytomètre et le volume ajusté afin d'obtenir 2×10^6 cellules par mL. Un volume de 100 μL de cellules est déposé dans chaque puits d'une plaque de 96 puits à fond clair (Corning 3595) et incubé durant 2 heures à 37°C avec 5% de CO_2 afin de permettre aux macrophages d'adhérer. Un lavage au HBSS sans phénol rouge est ensuite effectué afin d'éliminer les cellules non-adhérées.

Quantification de la production de NO par les macrophages péritonéaux

Le monoxyde d'azote est un radical libre instable en conditions aérobiques, rapidement oxydé en NO_2^- et en NO_3^- . La quantification de la production de NO par les macrophages est donc effectuée en évaluant la quantité de NO_2^- présente dans le surnageant de macrophages mis en culture et stimulés par l'IFN- γ , un activateur de

l'enzyme iNOS. La mesure de la production de NO est effectuée par une réaction colorimétrique à l'aide de Greiss Reagent (Sigma).

Suite à la récolte des macrophages péritonéaux, au lavage au HBSS sans phénol rouge et à l'élimination des cellules n'ayant pas adhéré à la plaque, un volume de 100 μ L de RPMI supplémenté modifié (Annexe 1) contenant une concentration de 500 U/puits d'IFN- γ est ajouté aux différents puits et les plaques sont incubées 48 heures à 37°C avec 5% de CO₂. Des puits dépourvus de macrophages sont utilisés à titre de contrôle négatif afin d'éliminer le bruit de fond induit par l'IFN- γ . La plaque est ensuite centrifugée à 800 \times g pendant 9 minutes puis 50 μ L de surnageant par puits est prélevé et transféré dans une nouvelle plaque. Un volume équivalent de Greiss Reagent (Sigma) est alors ajouté à chaque puits et la plaque est incubée à la noirceur et à température ambiante durant 15 minutes. La lecture de la production de NO₂⁻ est effectuée à l'aide d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 570 nm. La quantification de la production de NO dans chacun des puits est évaluée à l'aide d'une courbe standard de nitrite de sodium (de 0 à 100 μ M).

Immunohistochimie

Les animaux, Tg ou non, infectés ou non, sont euthanasiés par perfusion cardiaque après anesthésie. La perfusion cardiaque consiste en l'introduction lente et continue de PBS dans le cœur par le ventricule gauche en y introduisant un cathéter, puis à l'incision de l'oreillette droite, ce qui permet de faire circuler le PBS dans le système circulatoire de l'animal et ainsi remplacer le sang contenu dans les organes par du PBS. La rate, l'estomac (dont le *cardial-atrium fold*), le petit intestin, la muqueuse buccale et la langue sont ensuite prélevés, placés dans un Cryomold® (Sakura, Finetek) rempli d'OCT (Sakura, Finetek) puis déposés dans un bécher métallique lui-même placé sur glace sèche. Les organes ainsi congelés sont conservés à -80°C jusqu'à ce qu'ils soient coupés en sections de 5 μ m d'épaisseur à la plateforme d'histologie de l'Institut de recherche en immunologie et cancérologie

(IRIC). Ces sections sont déposées sur des lames et sont conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

Avant de procéder à l'immunohistochimie, les lames contenant les coupes d'organe sont immergées dans l'éthanol à 70% durant 15 secondes et ensuite incubées dans l'acétone froid pendant 5 minutes afin de fixer l'organe. Les lames sont ensuite immergées dans le PBS pour deux lavages d'une durée de 2 minutes chacun.

L'immunohistochimie est effectuée par une technique indirecte utilisant la peroxydase conjuguée à la streptavidine. Les tissus sont incubés 15 minutes dans une dilution de peroxyde d'hydrogène 0.3% afin d'éliminer la peroxydase endogène, puis lavés trois fois au PBS. Les tissus sont ensuite incubés dans différentes dilutions de sérum, selon l'anticorps primaire utilisé, afin de bloquer les sites de liaison non-spécifiques. Les coupes incubées avec les anticorps anti-F4/80 murin (Serotec Laboratories), anti-CD4 murin (BD Biosciences) ou anti-CD8 murin (BD Biosciences) sont incubées 20 minutes avec une dilution de 10% de sérum de lapin (Vector Laboratories) à laquelle 2.5% de sérum de souris (Sigma-Aldrich) est ajouté alors que les sections marquées avec l'anticorps anti-CD11c murin (BD Biosciences) sont incubées 25 minutes dans le sérum de chèvre à 1.5% (Vector Laboratories). Les tissus sont ensuite incubés 1 heure avec l'anticorps primaire anti-F4/80, -CD11c, -CD4 ou -CD8 à des concentrations de 10, 20, 2.5 et 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivement. Après trois lavages, les coupes d'organes sont incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la biotine, soit des anti-immunoglobulines G (IgG) de rat (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pour les coupes marquées avec l'anticorps primaire anti-F4/80, -CD4 et -CD8 ou des anti-IgG de hamster (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) pour les coupes marquées avec l'anti -CD11c. Afin de détecter les anticorps liés aux cellules d'intérêt, les tissus sont incubés 30 minutes avec la streptavidine couplée à la peroxydase (Vectastain *Elite* ABC Kit, Vector Laboratories). Après lavage, les cellules marquées sont visualisées par l'ajout de diaminobenzidine (Vector Laboratories), qui induit une coloration brunâtre après réaction avec la peroxydase, puis les tissus sont contre-colorés à l'hématoxyline de

Meyer. Les lames sont ensuite recouvertes d'une lamelle puis scellées à l'aide d'une solution de montage, ce qui permet de les conserver plusieurs années.

La rate est utilisée en tant que témoin positif pour chacun des anticorps primaires mentionnés et est incluse à chaque expérimentation. Les témoins négatifs sont obtenus en incubant chacun des tissus utilisés avec l'anticorps de contrôle isotypique approprié et ces derniers sont effectués simultanément au marquage avec l'anticorps primaire et ce à chaque expérimentation. Les colorations HPS et Gomori-Grocott, permettant respectivement d'observer l'histologie du tissu et la présence de *C. albicans*, ont été effectuées par l'équipe de la plateforme d'histologie de l'IRIC.

Les lames ont été visualisées à l'aide d'un microscope Zeiss Axio-Imager Z1 (Carl Zeiss) muni d'une caméra AxioCam et du logiciel d'acquisition Axio Vision 4.1. Le montage des images a été réalisé à l'aide des programmes Adobe Photoshop et Adobe Illustrator.

Immunofluorescence double

La double immunofluorescence est effectuée par une technique indirecte et séquentielle. L'anticorps anti-F4/80 (Serotec) est utilisé afin d'identifier la population macrophagique et les anticorps anti-MCP-1 murin (Hycult Biotechnologies) et anti-CD206 murin (BioLegend) sont utilisés afin d'identifier les macrophages M1 et M2, respectivement.

Les coupes de tissus sont traitées tel que mentionné précédemment et toutes les incubations sont effectuées à la noirceur et à température ambiante, sauf exception. Dans un premier temps, le marquage avec l'anticorps anti-F4/80 est effectué. Les coupes tissulaires sont d'abord incubées 30 minutes dans une dilution de sérum de lapin 10% additionné de 2.5% de sérum de souris, puis incubées une heure avec l'anticorps anti-F4/80 (10µg/mL). Après trois lavages au PBS, les coupes sont incubées 30 minutes avec une dilution d'anti-IgG de rat couplé à la biotine (10 µg/mL) puis, après trois autres lavages, avec le fluorochrome Texas Red couplé à la streptavidine (5µg/mL, Vector) durant 30 minutes.

Les mêmes coupes de tissus subissent trois lavages dans le PBS puis sont incubées une seconde fois avec la même dilution de sérums, pour une période de 15 minutes. Les tissus sont ensuite incubés avec le second anticorps primaire. L'anticorps anti-MCP-1 (10 µg/mL) est incubé 18 heures à 4°C alors que l'anticorps anti-CD206 (10 µg/mL) est incubé 1 heure à température pièce. Après trois lavages, les tissus sont incubés 30 minutes avec une dilution d'anti-IgG de rat biotinylé (10 µg/mL, Vector) puis, après trois autres lavages, le fluorochrome fluoresceine couplé à la streptavidine (5µg/mL, Vector) est ajouté pour 30 minutes. Les coupes sont encore lavées trois fois au PBS puis le montage est effectué avec le Vectashield Hard Set Mounting Medium (Vector) et les lames sont conservées à la noirceur à 4°C afin d'éviter que l'immunomarquage ne s'estompe.

La rate est utilisée en tant que témoin positif pour les anticorps anti-F4/80 et anti-CD206 et les témoins négatifs sont obtenus en incubant chacun des tissus étudiés avec l'anticorps isotypique approprié et ce à chaque expérimentation. Le témoin positif pour l'anticorps anti-MCP-1 est décrit à la section suivante.

L'immunomarquage a été visualisé à l'aide d'un microscope confocal (AxioVert LSM 510 Meta, Carl Zeiss) et les images montées à l'aide de Adobe Photoshop et de Adobe Illustrator.

Culture de macrophages *in vitro*

Étant donné l'absence de témoin positif permettant de vérifier la spécificité de l'anticorps anti-MCP-1, une immunofluorescence simple utilisant cet anticorps a été effectuée sur une culture de macrophages péritonéaux de souris non-Tg, élicités ou non au thioglycolate. Les macrophages sont recueillis et traités selon la procédure décrite pour la récolte de cellules d'exsudat péritonéal. Cependant, suite au décompte cellulaire effectué à l'hémacytomètre, le volume est ajusté afin d'obtenir 1×10^6 cellules par mL de RPMI supplémenté (Annexe 1). Un volume de 300 µL de cellules est ensuite disposé dans chacune des chambres d'une lame de culture (BD Falcon Culture Slides, BD Biosciences) et celles-ci sont incubées 24 heures à 37°C avec 5 % de CO₂. Le surnageant contenant les cellules non-adhérées est ensuite retiré et les

cellules lavées au HBSS, puis incubées dans 300 μ L de RPMI supplémenté (Annexe 1) contenant 2×10^2 U/mL d'IL-4 murin (Cedarlane Laboratories) ou 100 ng/ml de LPS (Sigma-Aldrich) durant 24 heures à 37°C avec 5 % de CO₂. Le LPS polarise les macrophages vers un phénotype M1, qui surexprime MCP-1 alors que l'IL-4 les polarise vers un phénotype M2. Le surnageant est ensuite éliminé, les cellules lavées au HBSS puis fixées 10 minutes dans 300 μ L de paraformaldéhyde (PFA) à 4 %. La PFA est ensuite neutralisée pendant 10 minutes par l'ajout de 300 μ L de NH₄Cl 50 mM. Les macrophages sont alors marqués par l'anticorps anti-MCP-1 tel que décrit à la section précédente. L'immunomarquage est visualisé à l'aide d'un microscope Nikon Eclipse 600 muni d'une caméra Nikon Digital camera DXM1200F.

Déplétion des macrophages

Afin d'évaluer l'effet de la déplétion *in vivo* des macrophages sur la charge de *C. albicans* au niveau de la cavité buccale, du tractus gastro-intestinal et des organes profonds de souris Tg et non-Tg, plusieurs groupes de souris ont été traités aux liposomes-clodronate, fournis par le Dr. Nico Van Rooijen du Département de biologie cellulaire de l'Université d'Amsterdam. Deux schémas expérimentaux ont été évalués :

Dans un premier temps, les animaux ont reçu une injection de 200 μ L de liposomes-clodronate par la voie intraveineuse au niveau de la queue aux jours 0, 1, 2 et 4 puis ont été euthanasiés par perfusion cardiaque au jour 6. Dans un second temps, les animaux ont reçu une injection intraveineuse de 200 μ L de liposomes-clodronate par la voie intraveineuse au niveau de la queue aux jours 0 et 2. Ils ont aussi subi des injections intra-jugales de 50 μ L ainsi qu'une application topique du même volume sur chacune des joues aux jours 0, 1 et 2. Les injections intra-jugales sont effectuées en prenant bien soin d'éviter l'injection intramusculaire du produit. Les animaux ont été euthanasiés au jour 4 par perfusion cardiaque.

La déplétion des macrophages au niveau de la muqueuse buccale, de l'intestin et de la rate est ensuite évaluée par cytométrie en flux et par immunohistochimie. Pour ce faire, des groupes de 7 souris sont formés puisque 5 souris sont nécessaires à l'obtention d'un nombre suffisant de cellules provenant de la muqueuse buccale pour évaluation en cytométrie en flux. L'immunohistochimie est effectuées selon le protocole décrit précédemment, en utilisant F4/80 seulement. Deux groupes témoins de 7 souris sont également formés et évalués selon les mêmes procédures. Ces groupes reçoivent respectivement des injections de liposomes-PBS ou de PBS seulement.

Préparation de la rate à la cytométrie en flux

La rate est prélevée puis broyée dans 3 mL de PBS. Le broyat est ensuite transféré dans un tube de 15 mL et centrifugé à $200 \times g$ pendant 9 minutes. La solution de lyse des érythrocytes (Annexe 1) est ensuite ajoutée, les cellules sont centrifugées, lavées dans 500 μ L de PBS puis centrifugées de nouveau. Les cellules sont resuspendues dans un volume de PBS nécessaire à l'obtention de 1×10^6 cellules par mL puis distribuées dans des tubes à raison de 250 μ L par tube. Différentes combinaisons d'anticorps permettant l'identification de la population macrophagique sont alors ajoutées aux différents tubes qui sont ensuite incubés à 4°C durant 30 minutes. Ces anticorps comprennent: un anti-CD45 murin (PE, BD Biosciences), un anti-CD11b murin (PerCP-Cy5.5, BD Biosciences), un anti-I-A^k murin (FITC, BD Biosciences), un anti-CD11c murin (FITC, BD Biosciences) et un anti-F4/80 murin (APC, Invitrogen). Les cellules subissent ensuite un dernier lavage puis l'analyse du marquage de surface est effectuée par cytométrie en flux à l'aide de l'appareil FACSCalibur (BD Biosciences) muni du logiciel CellQuest. La quantification des macrophages est exprimée en proportion de cellules CD45⁺, I-A^k⁺, CD11b⁺ et F4/80⁺ ou de cellules CD45⁺, CD11c⁻, CD11b⁺, F4/80⁺ par rapport aux cellules exprimant le marqueur de surface CD45.

Préparation des muqueuses à la cytométrie en flux

La muqueuse buccale ainsi qu'une portion du petit intestin sont prélevées et rincées dans 2 mL de solution de Hanks (HBSS, Gibco) puis incubées, sous agitation, dans 3 mL de solution de lavage (Annexe 1). Le tissu est ensuite découpé minutieusement puis incubé sous agitation 1 heure à 37°C dans 4 mL de RPMI supplémenté modifié (Annexe 1) contenant 1 % de collagénase de type IV. Après incubation, les portions de tissus non-digérées sont éliminées par filtration à l'aide d'un filtre de nylon de 80 µm, qui est ensuite rincé avec 6 mL de RPMI supplémenté modifié (Annexe 1). Les cellules ainsi recueillies sont centrifugées puis resuspendues dans un volume de PBS nécessaire à l'obtention de 250 µL de suspension cellulaire par tube. Contrairement à la rate, l'ajustement du volume ne se fait pas en fonction d'un nombre précis de cellules puisque le nombre de cellules CD45+ à la muqueuse buccale ne correspond qu'à 1 à 5% du nombre de cellules totales. Les cellules sont ensuite marquées, traitées et analysées selon la même procédure que celle décrite pour les cellules de la rate.

Analyses statistiques

Les différences de la charge buccale de *C. albicans* des animaux Tg et non-Tg CD4C/HIV^{MutG} *NOS2*^{-/-} et *NOS2*^{+/-} ont été comparées en utilisant le programme SPSS (SPSS). L'analyse de la variance a été effectuée par un ANOVA avec mesures répétées en fonctions du groupe (variance résiduelle) et du temps (variance inter-traitement). Les interactions significatives ($P < 0.05$) ainsi obtenues ont ensuite été analysées en comparant les moyennes des groupes à des temps fixes par un test t de Student bilatéral pour échantillons indépendants. La comparaison des fonctions de survie de ces mêmes animaux a été effectuée par la méthode de Kaplan-Meier et du test *log-rank*. Le test exact de Fisher a été utilisé afin de comparer la proportion d'animaux ayant survécu à la toute fin de l'expérimentation. Finalement, les différences de production de NO par les macrophages des animaux Tg et non-Tg CD4C/HIV^{MutG} *NOS2*^{-/-} et *NOS2*^{+/-} ont été comparées par un test t de Student

unilatéral pour échantillons indépendants. Les différences sont considérées significatives à une valeur de $P < 0.05$.

Résultats

Infection de souris Tg CD4C/HIV^{MutA}

Des souris Tg (n=15) ainsi que des témoins non-Tg (n=6) ont été infectées oralement avec *C. albicans* LAM-1 pour une période de 70 jours où jusqu'à l'apparition des points limites annonçant la mort imminente de l'animal. Les charges buccales moyennes du champignon, prélevées quotidiennement (primo-infection) et hebdomadairement (porteur chronique) sont présentées à la figure 7.

La primo-infection, qui s'étend du jour 1 au jour 7, est caractérisée par un pic de CFUs buccaux atteignant jusqu'à $2,9 \times 10^3$ levures pour le groupe de souris Tg alors qu'il atteint seulement $7,1 \times 10^2$ pour le groupe témoin non-Tg. Les souris Tg présentent un état de porteur chronique débutant au jour 9 post-infection et maintenu tout au long de l'expérimentation. Une recrudescence de la croissance du champignon survient peu avant le décès et correspond à l'apparition des points limites (figure 8). Pour leur part, les animaux non-Tg présentent une charge buccale inférieure aux animaux Tg au cours de la primo-infection, le champignon est éliminé de la cavité buccale de ces animaux 7 jours suivant l'inoculation (figure 7). Ces résultats correspondent à la cinétique d'infection observée précédemment chez cette lignée de souris (de Repentigny, Aumont et al. 2002).

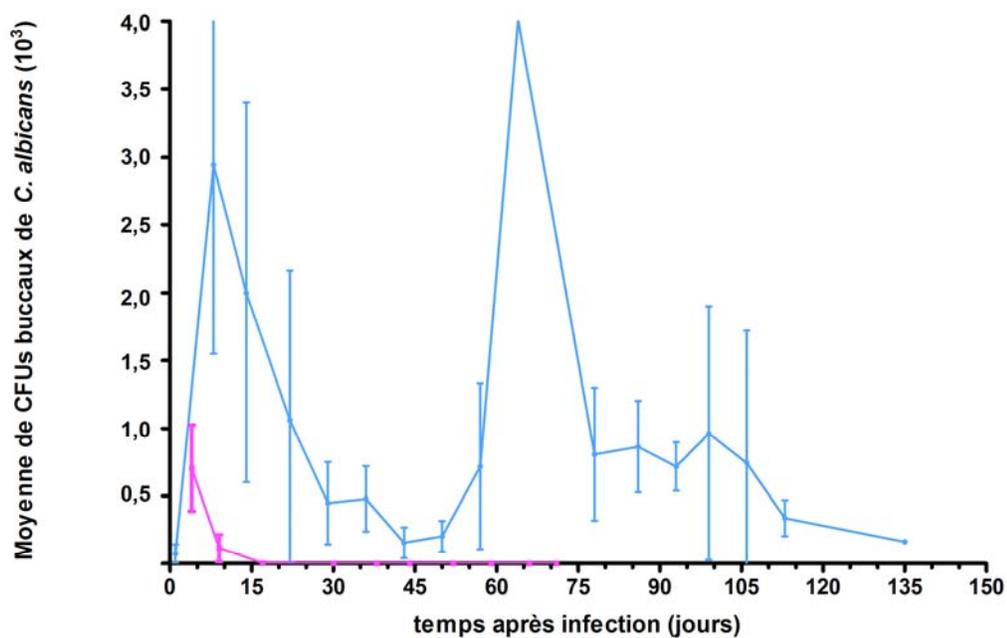


Figure 7 : Charges buccales moyennes \pm écart type de *C. albicans* LAM-1 retrouvées chez des souris Tg CD4C/HIV^{MutA} infectées jusqu'à l'apparition des points limites (pré-mortem) (bleue) et chez des souris non-Tg infectées 70 jours (rose).

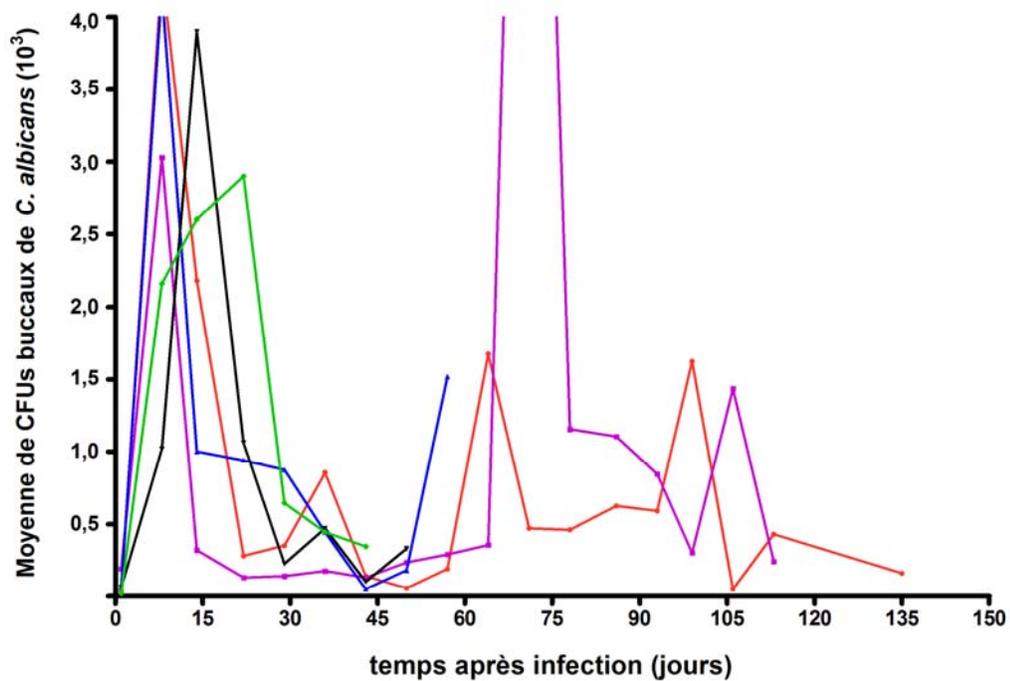


Figure 8 : Charges buccales de *C. albicans* LAM-1 retrouvées chez chacun des 6 sujets Tg CD4C/HIV^{MutA} infectés jusqu'à l'apparition des points limites.

La description des différents groupes expérimentaux utilisés pour les études pathologiques et d'immunohistochimie est présentée au Tableau I.

Tableau I: Description des différents groupes expérimentaux utilisés pour les études pathologiques et d'immunohistochimie sur les tissus de souris Tg et non-Tg, infectées ou non au *C. albicans*.

Souris	Nombre inoculé	Âge moyen en jours (écart)		Tissus étudiés
		inoculation	euthanasie	
Tg				
Infectées				
Pré-mortem	6	74 (62-90)	165 (125-227)	Joues Langue Estomac
70 jours	2	42	112	Langue Estomac
Non-Infectées				
Pré-mortem	4	60 (53-71)	128 (115-145)	Joues Langue Estomac
70 jours	3	59 (48-71)	122 (110-140)	Joues Langue Estomac
Non-Tg				
Infectées				
70 jours	3	46 (40-59)	143 (143-144)	Joues Langue Estomac
Non-Infectées				
70 jours	3	55 (48-59)	115 (110-117)	Joues Langue Estomac

Bien que la durée de l'infection chez les souris Tg infectées au *C. albicans* soit variable (50 à 135 jours) (figure 8), la pathologie observée tant au niveau de la muqueuse gastrique que buccale est la même chez tous les sujets étudiés

La coloration de Gomori-Grocott permet l'observation et la localisation des hyphes de *Candida* ayant pénétré les muqueuses des souris Tg infectées. Après 70 jours d'infection, les hyphes de *C. albicans* ont pénétré la muqueuse gastrique jusqu'à la lamina propria en détruisant le *cardial-atrium fold* chez ces souris Tg (figure 9A). Ces hyphes sont entourées d'un nombre important de polymorphonucléaires neutrophiles et la sous-muqueuse située immédiatement sous les hyphes contient des infiltrations étendues de cellules mononuclées, tel que révélé par la coloration HPS (figure 9A). Chez les souris pré-mortem, les hyphes de *Candida* pénètrent la muqueuse gastrique beaucoup plus profondément, atteignant la sous-muqueuse qui contient également des infiltrations massives de cellules mononuclées. Tel que chez les animaux infectés 70 jours, le champignon est cerné par un nombre considérable de polymorphonucléaires neutrophiles, et le *cardial-atrium fold* est complètement détruit (figure 9A). Contrairement aux deux groupes mentionnés précédemment, la muqueuse gastrique de souris Tg non-infectées était complètement dépourvue d'hyphes de *C. albicans*, de polymorphonucléaires neutrophiles et d'infiltrats de cellules mononuclées (figure 9A). Il en était de même en ce qui concerne la muqueuse gastrique des souris non-Tg, infectées ou non à *C. albicans*. Ceci démontre que les souris Tg conservent la capacité à recruter des cellules immunitaires en réponse à *C. albicans* malgré la présence du transgène.

A

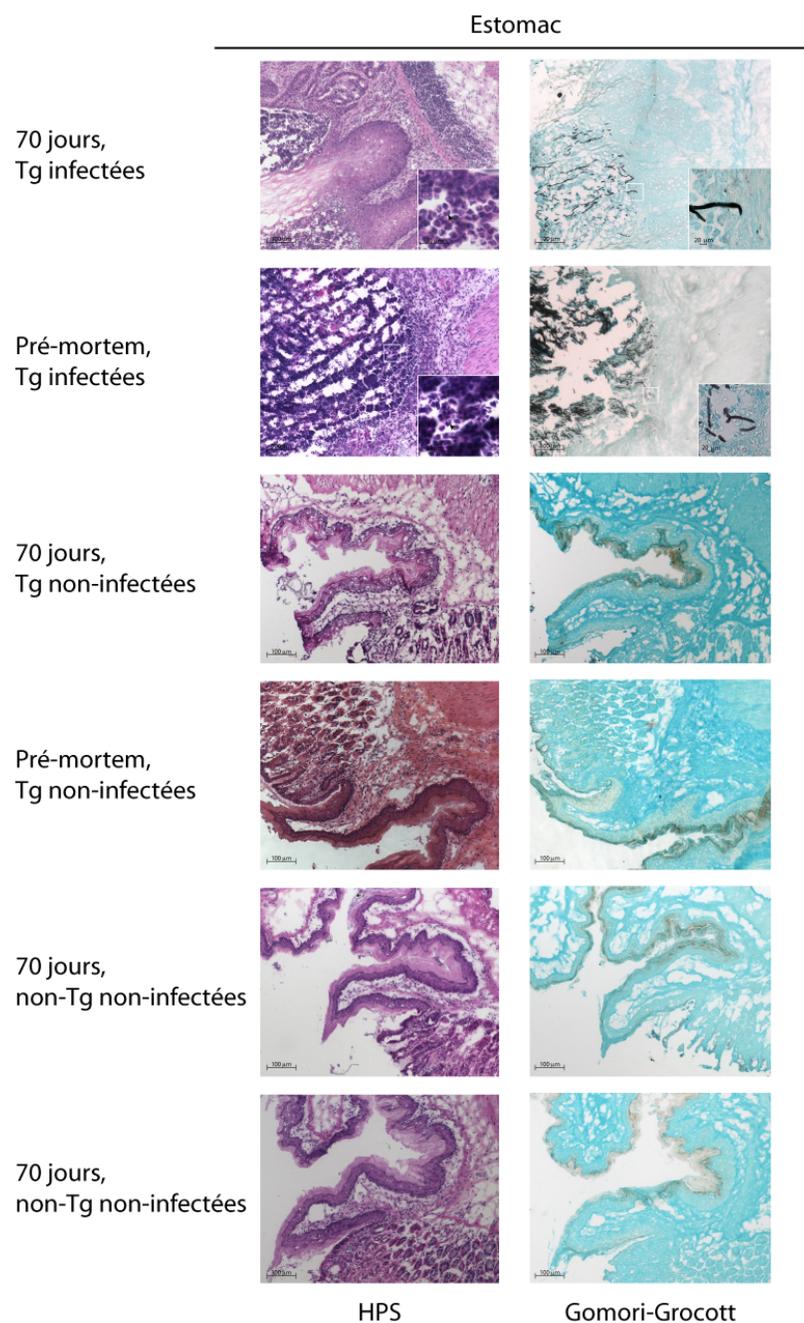


Figure 9A : Coloration de la muqueuse gastrique de souris Tg CD4C/HIV^{MutA} infectées oralement à *C. albicans* LAM-1 durant 70 jours ou jusqu'à l'apparition des points limites (pré-mortem) et de différents groupes témoins. Les encadrés représentent la portion agrandie dans les insertions et les flèches identifient les polymorphonucléaires neutrophiles (HPS Tg infectées 70 jours et pré-mortem). Les images représentent au moins trois expérimentations ayant produit des résultats similaires.

B

Estomac

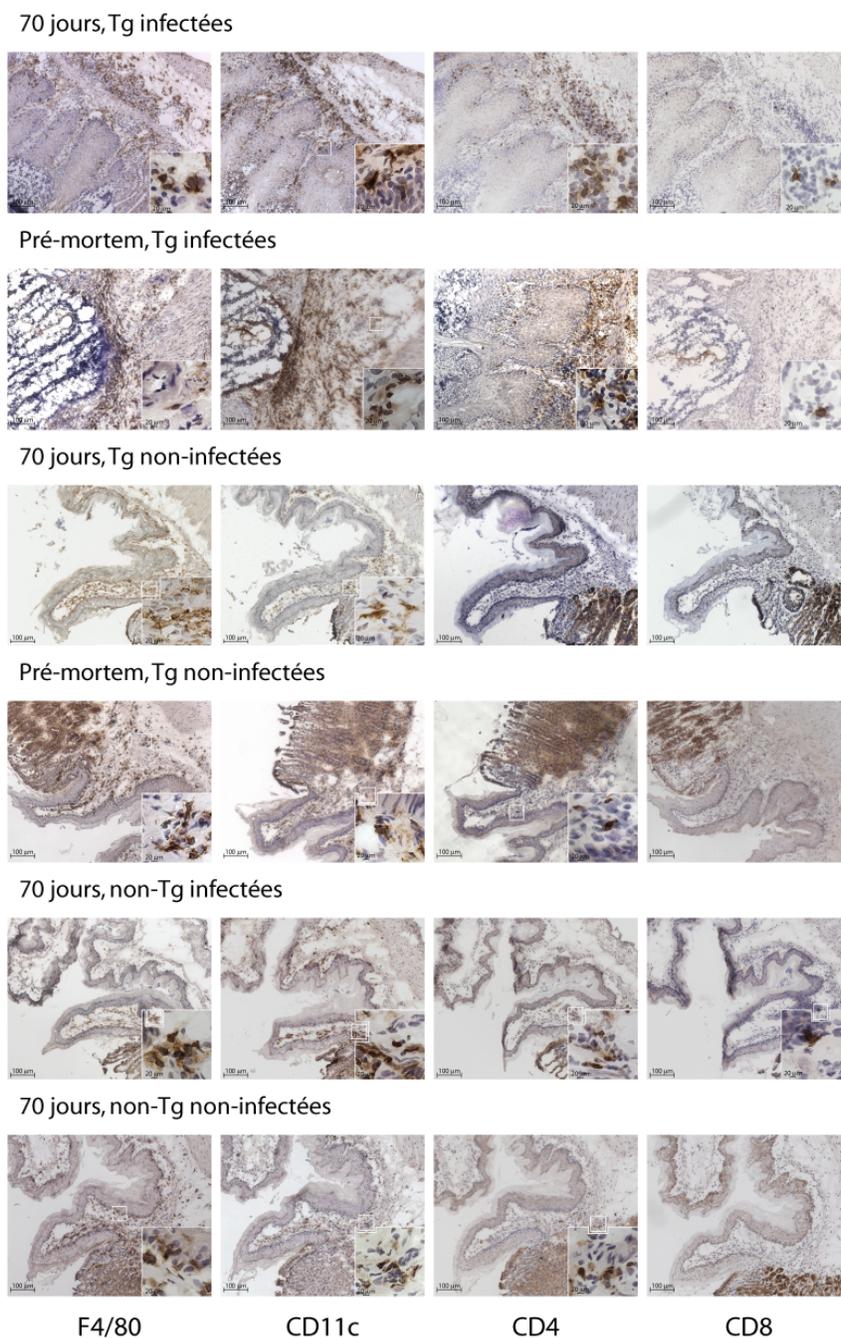


Figure 9B : Immunohistochimie de la muqueuse gastrique de souris Tg CD4C/HIV^{MutA} infectées oralement à *C. albicans* LAM-1 durant 70 jours ou jusqu'à l'apparition des points limites (pré-mortem) et de différents groupes témoins. Les encadrés représentent la portion agrandie dans les insertions. Les images représentent au moins trois expérimentations ayant produit des résultats similaires.

Contrairement à la muqueuse gastrique, les hyphes de *C. albicans* sont confinées à la couche superficielle de l'épithélium au niveau de la muqueuse jugale et de la muqueuse linguale, et ce après 70 jours d'infection ou peu avant le décès (prémortem) (figure 9C). Cette invasion par la forme hyphe de *C. albicans* n'induit ni le recrutement de polymorphonucléaires neutrophiles ni l'érosion du tissu. Bien que des cellules mononuclées soient présentes dans l'épithélium situé directement sous les hyphes, ces dernières sont plutôt organisées en foyers localisés (figure 9C) et non en un infiltrat massif tel que décrit pour l'estomac. Finalement, les muqueuses jugale et linguale des animaux non-Tg infectés sont dépourvues d'hyphes de *C. albicans* et, tout comme les autres groupes témoins non-infectés, de PMNs (figure 9C).

C

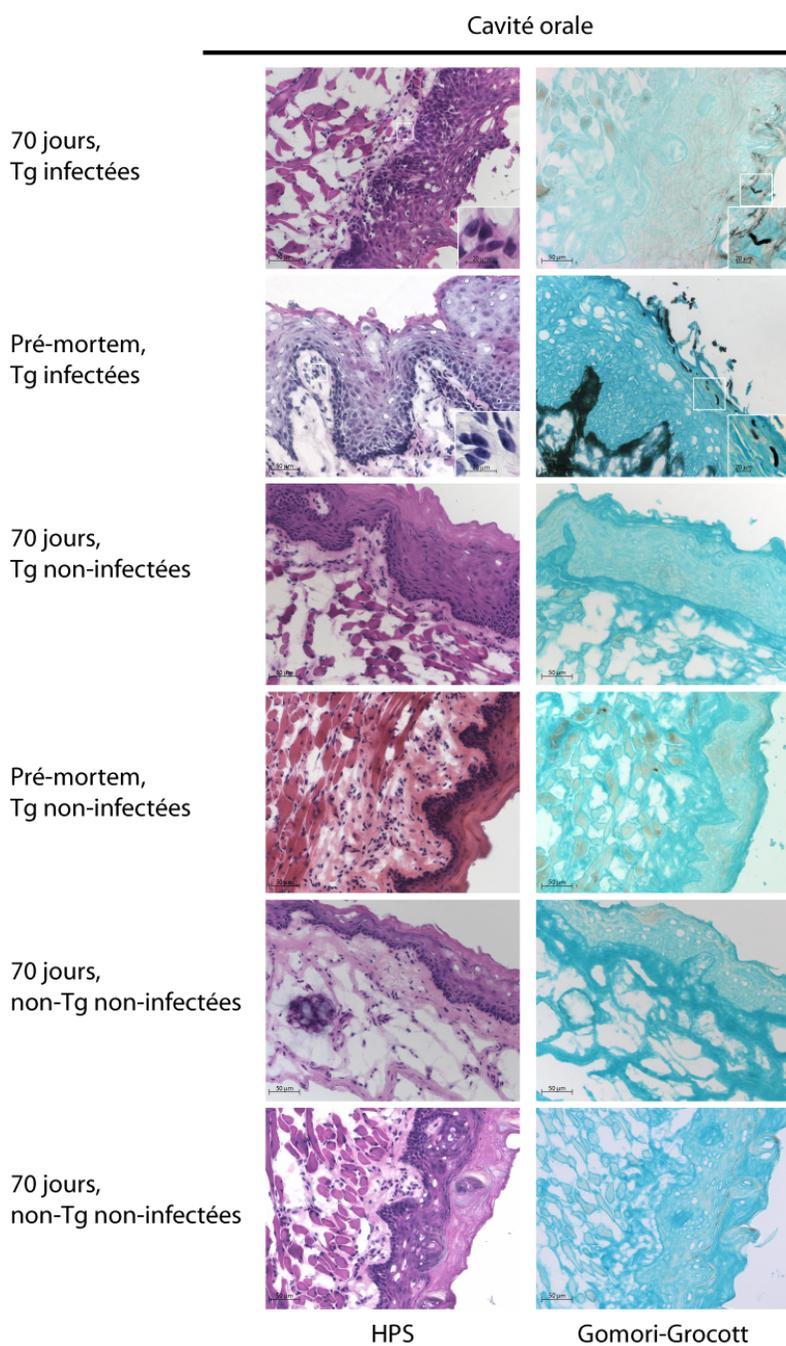


Figure 9C : Coloration de la muqueuse buccale de souris Tg CD4C/HIV^{MutA} infectées oralement à *C. albicans* LAM-1 durant 70 jours ou jusqu'à l'apparition des points limites (pré-mortem) et des différents groupes témoins. Les encadrés représentent la portion agrandie dans les insertions. Les images représentent au moins trois expérimentations ayant produit des résultats similaires.

D

Cavité orale

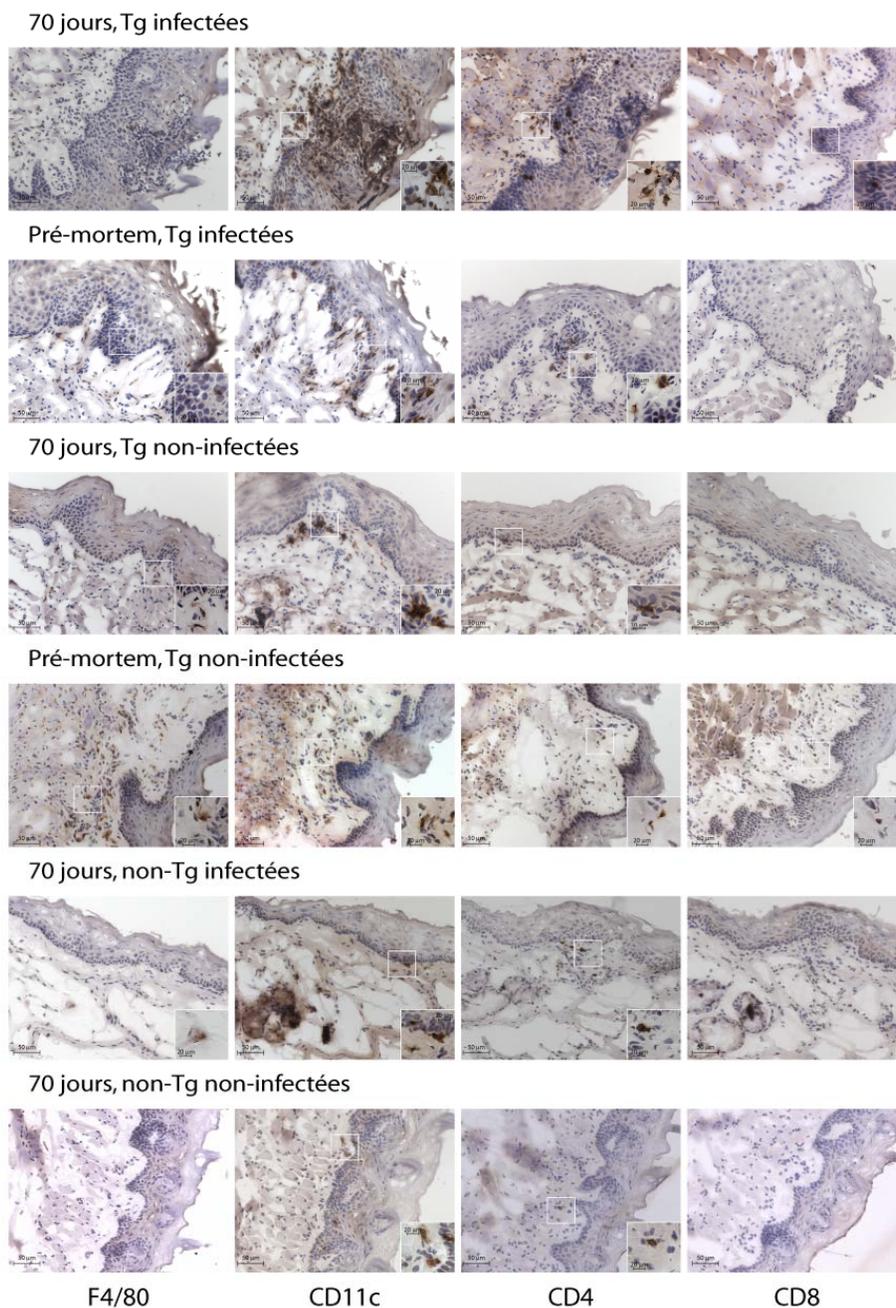


Figure 9D : Immunohistochimie de la muqueuse buccale de souris Tg CD4C/HIV^{MutA} infectées oralement à *C. albicans* LAM-1 durant 70 jours ou jusqu'à l'apparition des points limites (pré-mortem) et des différents groupes témoins. Les encadrés représentent la portion agrandie dans les insertions. Les images représentent au moins trois expérimentations ayant produit des résultats similaires.

Immunohistochimie

Afin d'identifier les cellules mononuclées composant les infiltrats cellulaires retrouvés au niveau du *cardial-atrium fold* et les foyers épars présents au niveau des muqueuses buccales et linguales, des analyses immunohistochimiques ont été effectuées sur ces différents tissus, en utilisant les mêmes groupes expérimentaux et témoins que ceux présentés au Tableau I.

Chez les animaux Tg infectés durant 70 jours à *C. albicans*, les infiltrats de cellules mononuclées retrouvés dans la muqueuse gastrique sont composés principalement de cellules F4/80+, CD11c+ et CD4+ et plus rarement de CD8+ (figure 9A et B). Ces mêmes cellules sont également distribuées en périphérie des infiltrats, au niveau de l'interstitium. Chez les souris Tg pré-mortem infectées, les infiltrats sont aussi composés de cellules F4/80+, CD11c+, CD4+ et de CD8+, qui se retrouvent à proximité des hyphes de *Candida* alors que ces mêmes cellules se trouvent à bonne distance du champignon chez les animaux infectés 70 jours. Contrairement aux deux groupes mentionnés précédemment, la muqueuse gastrique des souris Tg non-infectées, 70 jours ou pré-mortem, ne contient que des cellules F4/80+ et CD11c+ dispersées au niveau de la lamina propria. Très peu de cellules CD4+ sont présentes et une absence de cellules CD8+ est observée (figure 9B). Ces résultats démontrent que, malgré la déplétion et l'altération des fonctions des cellules dendritiques et des lymphocytes T CD4+ démontrées chez ce modèle murin (de Repentigny, Aumont et al. 2002; Lewandowski, Marquis et al. 2006), ces animaux transgéniques conservent leur capacité à induire une réponse inflammatoire en recrutant ces deux populations cellulaires ainsi que des cellules F4/80+ et CD8+ en réponse à l'infection par *C. albicans*. Les populations cellulaires présentes à la muqueuse gastrique des animaux non-Tg, infectés ou non, sont les mêmes que celles décrites chez les souris Tg non-infectées et sont similaires en terme d'abondance à l'exception des cellules CD4+ dont la densité est supérieure chez les animaux non-Tg

par rapport aux animaux Tg et chez qui ce nombre est d'avantage augmenté par l'infection à *Candida*.

Tout comme à la muqueuse gastrique, l'infection par *C. albicans* induit le recrutement de cellules F4/80+, CD11c+, CD4+ et plus rarement de cellules CD8+ à la muqueuse buccale des souris Tg pré-mortem infectées alors qu'après 70 jours d'infection, un recrutement important de cellules CD11c+ et CD4+ est observé mais peu de cellules F4/80+ et CD8+ sont présentes (figure 9D). De façon similaire à l'estomac, seules les cellules F4/80+ et CD11c+ sont présentes au niveau de la lamina propria de la muqueuse buccale des animaux Tg non-infectés (70 jours ou pré-mortem) alors que les cellules CD4+ et CD8+ sont rarement observées. La capacité des animaux Tg à induire une réponse inflammatoire en réponse à *C. albicans* est donc conservée au niveau de la muqueuse buccale, bien que cette réponse soit plus modeste que celle observée au niveau du *cardial-atrium fold* de l'estomac. La muqueuse buccale des animaux non-Tg infectés et non-infectés contient principalement des cellules CD11c+ et CD4+. Ces dernières sont localisées au niveau de la lamina propria et de la membrane basale et sont plus nombreuses dans le cadre de l'infection, malgré l'absence d'hyphes de *C. albicans* chez ces animaux non-Tg (figure 9C). Une diminution notable de la densité de cellules F4/80+ est également observée au niveau de la muqueuse buccale par rapport à la muqueuse gastrique, et ce peu importe le groupe de souris étudié. Des différences en termes de densité de macrophages sont également observées à la cavité orale elle-même, entre les muqueuses linguale et jugale puisque la première ne semble contenir que très peu de macrophages résidents alors qu'à la muqueuse jugale, un certain nombre de macrophages résidents est présent. Une absence de macrophages est observée en réponse à *C. albicans* à la muqueuse linguale tandis que ce recrutement survient à la muqueuse jugale (figure 9D).

Immunofluorescence

Afin de préciser davantage le rôle potentiel des macrophages dans le confinement de *C. albicans* aux muqueuses, la proportion de macrophages de phénotype d'activation classique (M1) ou alternative (M2) a été évaluée en immunofluorescence chez des souris Tg infectées à *C. albicans* durant 70 jours ou jusqu'à l'apparition des points limites, au niveau de la muqueuse buccale et de la muqueuse gastrique (Tableau I). L'évaluation de cette proportion de macrophages M1/M2 est effectuée à l'aide de souris Tg infectées seulement puisque la polarisation des macrophages vers un phénotype ou l'autre nécessite une stimulation, induite par *C. albicans*. De plus, tel que démontré aux figures 9B et D, l'obtention d'une densité tissulaire suffisante de macrophages nécessite le recrutement de ces derniers, qui survient uniquement chez les souris Tg infectées au *C. albicans*.

Puisqu'aucun tissu témoin n'était disponible pour le marquage de l'anticorps anti-MCP-1, une immunofluorescence simple a été réalisée sur des macrophages péritonéaux provenant de vieilles souris non-Tg élicitées ou non au thioglycolate. Seuls les macrophages stimulés au LPS (polarisation vers un phénotype M1) sont marqués par l'anticorps anti-MCP-1. Bien que les macrophages stimulés ou non à l'IL-4 présentent un certain marquage (figure 10), ce dernier est sensiblement le même que celui obtenu avec l'anticorps témoin isotypique et correspond plus vraisemblablement à la fluorescence endogène des macrophages.

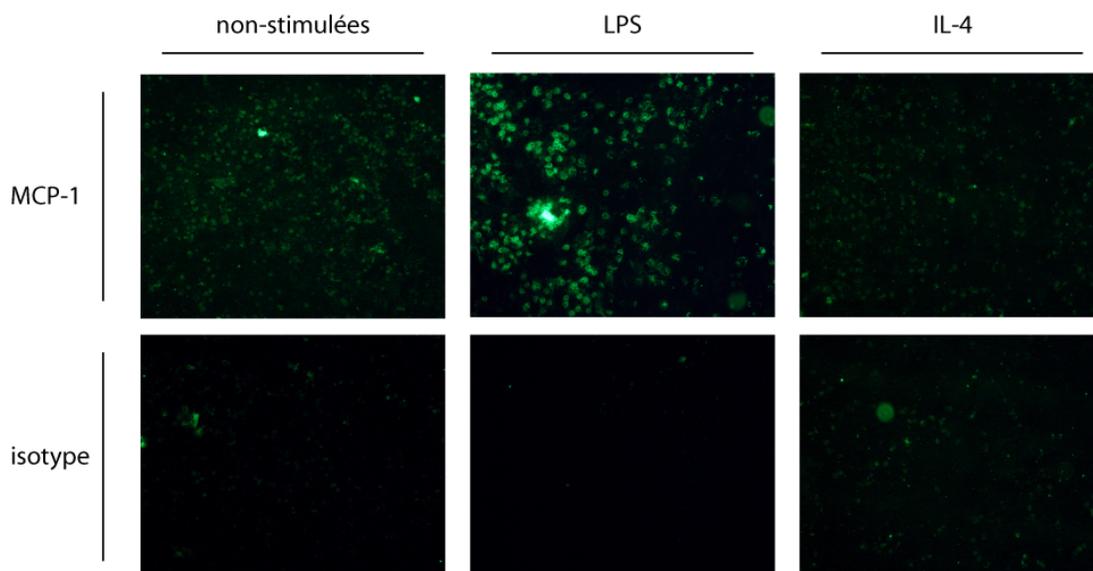


Figure 10 : Immunofluorescence simple de macrophages péritonéaux provenant de souris non-Tg élicitées ou non au thioglycolate. Ces macrophages ont été mis en culture puis stimulés à l'IFN- γ ou à l'IL-4 afin d'induire la polarisation vers un phénotype d'activation classique (M1) ou alternative (M2), respectivement. Ces images représentent trois expérimentations ayant produit des résultats similaires.

L'anticorps anti-F4/80 murin permet de cibler la population macrophagique et les macrophages M1 et M2 sont identifiés respectivement à l'aide des anticorps anti-MCP-1 et anti-CD206. Les cellules F4/80+ recrutées aux muqueuses buccale et gastrique des animaux Tg en réponse à *C. albicans* expriment presque uniformément le récepteur du mannose (CD206) et rarement MCP-1, ce qui correspond à un phénotype d'activation alternative (M2) (figure 11). Des résultats identiques ont été obtenus avec des souris Tg infectées 70 jours (données non-présentées).

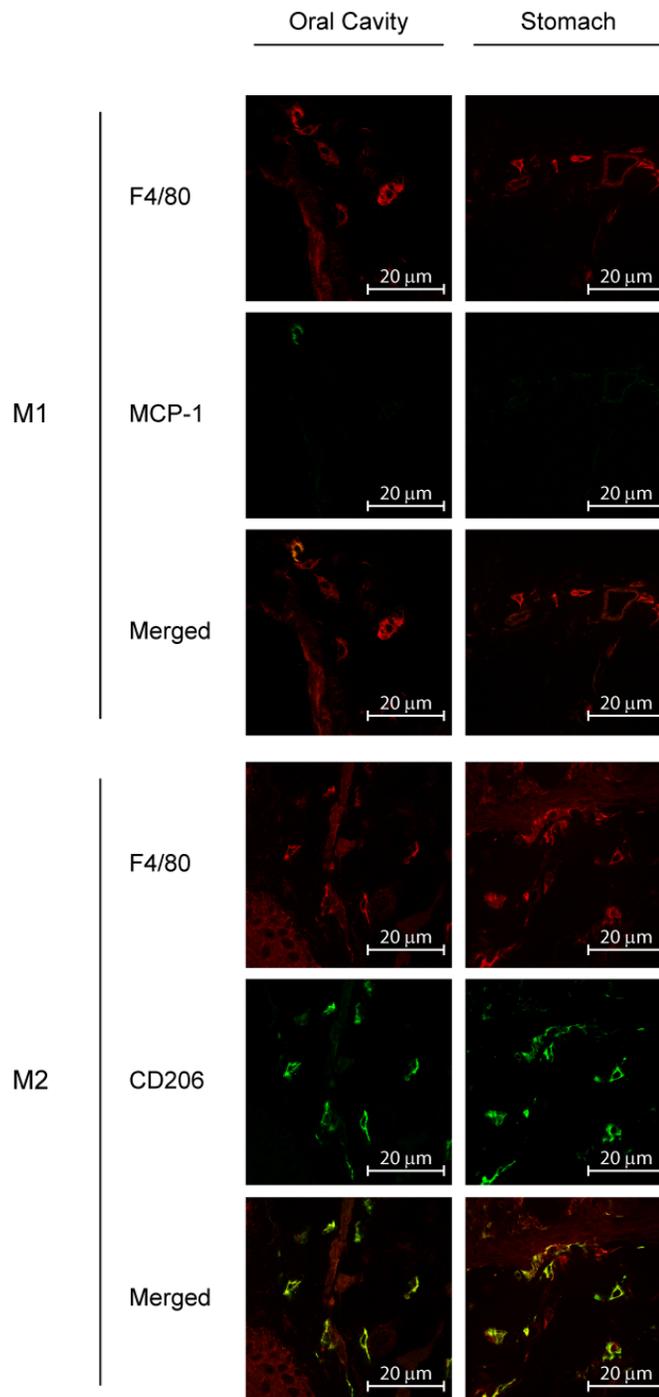


Figure 11 : Double immunofluorescence des muqueuses gastrique et buccale obtenues de souris CD4C/HIV^{MutA} pré-mortem infectées oralement à *C. albicans* LAM-1. La population macrophagique est identifiée à l'aide de l'anticorps anti-F4/80 murin et les macrophages d'activation classique (M1) ou alternative (M2) sont identifiés à l'aide des anticorps anti-MCP-1 et anti-CD206 murins, respectivement. Les images représentent au moins trois expérimentations ayant produit des résultats similaires.

Infection de souris Tg CD4C/HIV^{MutG} iNOS^{-/-} et Tg CD4C/HIV^{MutG} iNOS^{+/-}

Afin de déterminer si la production de monoxyde d'azote contribue au confinement de *C. albicans* aux muqueuses, deux groupes de dix souris Tg présentant une mutation homozygote ou hétérozygote du gène *NOS2* ont été infectés oralement avec *C. albicans* LAM-1. Ces deux groupes de souris Tg, ainsi que leurs groupes témoins non-Tg respectifs, ont été fournis par le laboratoire du Dr Paul Jolicoeur. Les charges buccales de ces animaux ont été analysées longitudinalement sur une période de 157 jours (figure 12A).

A

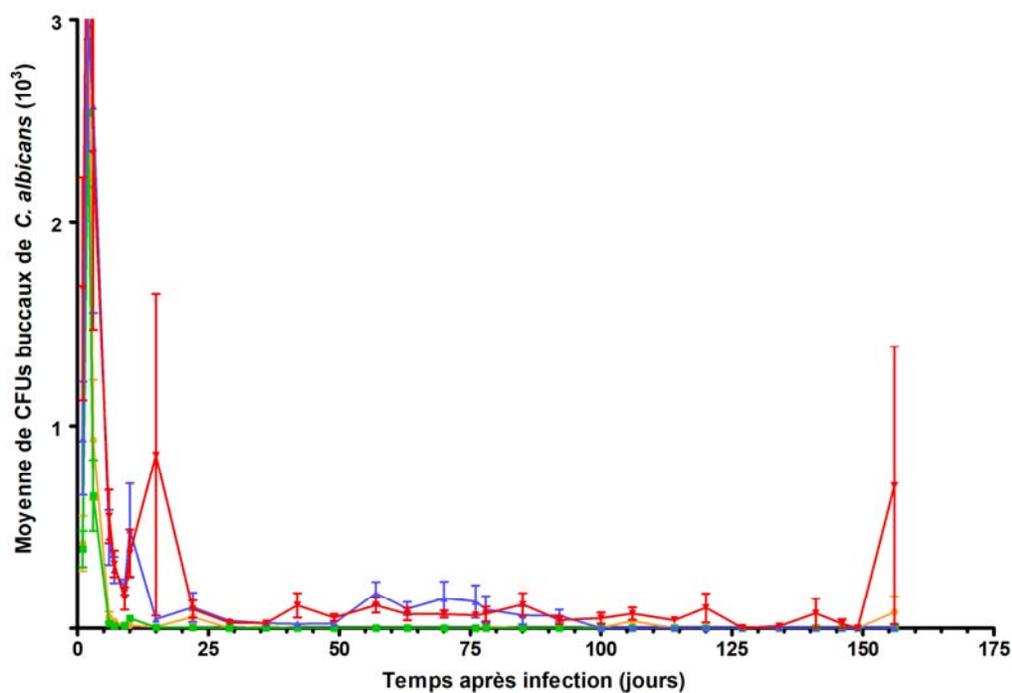


Figure 12A : Charge buccale moyenne \pm écart type de *C. albicans* LAM-1 retrouvée chez des souris Tg CD4C/HIV^{MutG} NOS2^{-/-} (rouge), Tg CD4C/HIV^{MutG} NOS2^{+/-} (bleu) ainsi que chez leurs témoins non-Tg NOS2^{-/-} (vert) et NOS2^{+/-} (jaune) entre les jours 1 et 157 post-infection.

Au cours de la primo-infection, du jour 1 au jour 15 post-infection, la charge buccale des animaux Tg homozygotes et hétérozygotes a été significativement ($p < 0.001$) plus élevée que celle des animaux non-Tg, avec des pics atteignant 4.1×10^3 et 3.0×10^3 CFUs, respectivement (figure 12A). Les souris Tg présentaient un état de porteur chronique (jour 22 à 92) alors que les souris non-Tg ont rapidement éliminé le champignon après la primo-infection. Quelques animaux non-Tg présentaient toutefois des pics épisodiques de récurrence s'expliquant probablement par de faibles charges du champignon au niveau du tractus gastro-intestinal (figure 12A). Cependant, aucune différence significative ($p > 0.05$) n'a été observée entre la charge buccale des animaux Tg homozygotes et hétérozygotes, indiquant que la prolifération du champignon n'est pas augmentée par la perte de fonction complète ou partielle de l'enzyme iNOS chez les animaux Tg ou non-Tg.

Durant les 157 jours d'observation de l'infection buccale de ces animaux, le taux de mortalité a également été analysé. Des décès sont survenus uniquement chez les animaux transgéniques homozygotes et hétérozygotes, avec 50 % des animaux décédés après 89 et 76 jours respectivement, alors que tous les animaux non-Tg ont survécu (figure 12B). Cependant, la survie des animaux Tg homozygotes et hétérozygotes n'est pas significativement différente ($p = 0.66$), démontrant que la perte d'expression du gène *NOS2* n'accélère pas la mortalité chez ces animaux.

Les animaux Tg présentant une combinaison de trois points limites ont été euthanasiés et leurs organes profonds prélevés, disséqués et broyés dans le but de quantifier la charge de *C. albicans*. La même procédure a été appliquée aux animaux non-Tg euthanasiés à la toute fin de l'expérimentation. Aucune trace du champignon n'a été observée aux organes profonds (reins, foie, poumons, cerveau), à l'exception d'un sujet Tg CD4C/HIV^{MutG} iNOS^{+/-} présentant un très faible décompte au niveau des reins (Tableau II). La grande majorité des animaux Tg présente une charge importante de *C. albicans* au niveau de l'estomac, du petit et du gros intestin alors qu'un seul sujet non-Tg hétérozygote présente des décomptes au niveau du tractus

gastro-intestinal, mais qui sont cependant de 10 à 100 fois inférieurs à ceux retrouvés chez les animaux Tg (Tableau II).

B

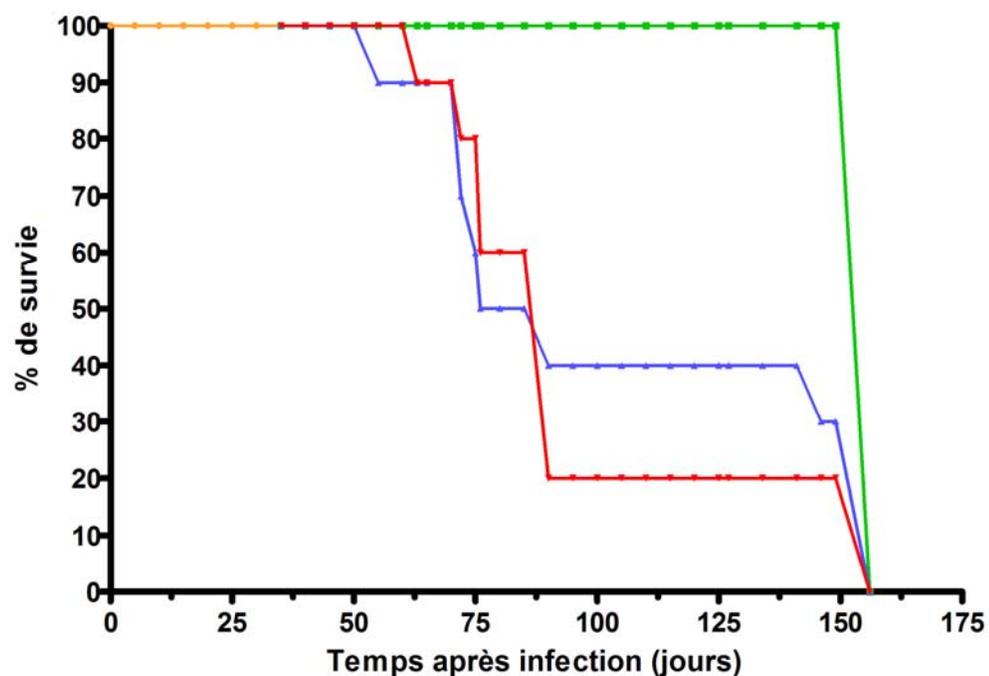


Figure 12B : Taux de survie de souris Tg CD4C/HIV^{MutG} NOS2^{-/-} (rouge), CD4C/HIV^{MutG} NOS2^{+/-} (bleu) ainsi que leurs témoins non-Tg NOS2^{-/-} (vert) et NOS2^{+/-} (jaune) infectées oralement à *C. albicans* LAM-1 durant 157 jours (Tg NOS2^{+/-} ou NOS2^{-/-}), 156 jours (non-Tg NOS2^{-/-}) et 155 jours (non-Tg NOS2^{+/-}).

Tableau II. Décomptes moyens des charges de *C. albicans* (CFU/g) retrouvés aux organes profonds de souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV^{MutG} iNOS infectées oralement.

Variable	Souris ^a			
	Tg		Témoins non-Tg	
	iNOS +/-	iNOS -/-	iNOS +/-	iNOS -/-
	10	10	10	9
Âge moyen au moment du sacrifice, en jours (étendue)	155 (106-205) ^b	145 (112-205) ^b	209 ^c (203-222)	210 ^d (204-222)
Organes infectés par <i>C. albicans</i>				
Cerveau				
Nb d'animaux	0	0	0	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , cfu/g	ND	ND	ND	ND
Étendue	ND	ND	ND	ND
Poumons				
Nb d'animaux	0	0	0	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , cfu/g	ND	ND	ND	ND
Étendue	ND	ND	ND	ND
Foie				
Nb d'animaux	0	0	0	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , cfu/g	ND	ND	ND	ND
Étendue	ND	ND	ND	ND
Reins				
Nb d'animaux	1	0	0	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , cfu/g	8.0x10 ¹	ND	ND	ND
Étendue	ND	ND	ND	ND
Estomac				
Nb d'animaux	8	8	1	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , cfu/g	8.1x10 ⁴	5.6x10 ⁴	3.3x10 ³	ND
Étendue	2.0x10 ² - 4.9x10 ⁵	1.8x10 ² - 3.3x10 ⁵	ND	ND
Petit intestin				
Nb d'animaux	6	7	1	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , cfu/g	1.9x10 ³	2.1x10 ⁴	2.8x10 ²	ND
Étendue	1.4x10 ² - 9.9x10 ³	5.3x10 ¹ - 1.4x10 ⁵	ND	ND
Gros intestin				
Nb d'animaux	8	9	1	0
Décompte moyen de <i>C. albicans</i> , cfu/g	5.1x10 ³	4.2x10 ³	7.7x10 ²	ND
Étendue	3.9x10 ² - 1.2x10 ⁴	1.1x10 ² - 1.8x10 ⁴	ND	ND

ND, non détecté

^a les souris étudiées, Tg et non-Tg, proviennent de la progéniture dérivée de la souris fondatrice F27367

^b sacrifice effectué au jour de l'euthanasie en raison de signes de maladie sévère, les survivants ont été euthanasiés 157 jours post-infection à *C. albicans*.

^c les 10 souris ont survécu et ont été euthanasiées 155 jours post-infection à *C. albicans*.

^d les 9 souris ont survécu et ont été euthanasiées 156 jours post-infection à *C. albicans*

Afin d'évaluer la production de NO chez les animaux hétérozygotes et homozygotes pour l'expression de *NOS2*, la production de NO par les macrophages péritonéaux élicités de trois souris non-Tg *NOS2*^{+/-} et de trois souris non-Tg *NOS2*^{-/-} a été mesurée et comparée à celle de macrophages péritonéaux provenant de trois souris non-Tg *NOS2*^{+/+}. Ces animaux ont reçu une injection intra-péritonéale de thioglycolate, puis, trois jours plus tard, les macrophages ont été recueillis, mis en culture et la production extracellulaire de NO a été quantifiée dans le surnageant après stimulation de l'enzyme iNOS à l'aide d'IFN- γ (500 U/puits). Les animaux *NOS2*^{+/-} présentaient une diminution de près de 50% de la production normale de NO ($P < 0.05$) alors que les animaux *NOS2*^{-/-} présentaient une production similaire à celle obtenue avec les témoins négatifs ($P > 0.05$).

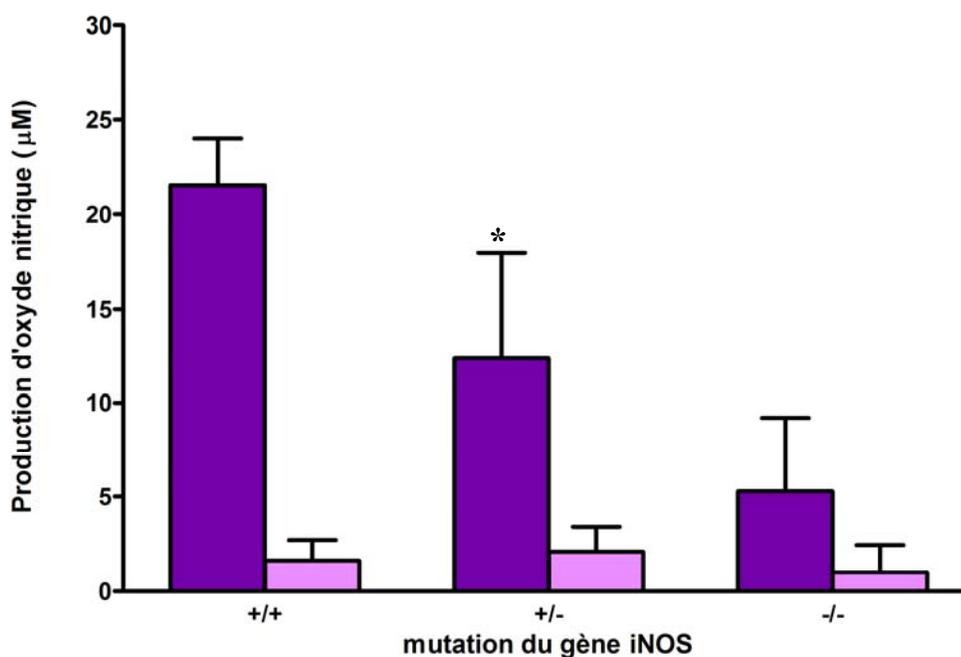


Figure 13 : Production d'oxyde nitrique (moyenne \pm écart type) par les macrophages péritonéaux de souris non-Tg *NOS2*^{+/+}, *NOS2*^{+/-} et *NOS2*^{-/-} (violet) exposés à l'IFN- γ durant 48 heures et par leurs témoins négatifs respectifs (lilas). *, $P < 0,05$ par rapport aux animaux *NOS2*^{+/+}.

Déplétion des macrophages

Des expériences de déplétion des macrophages ont été effectuées afin d'évaluer l'effet de celle-ci sur la charge buccale de *C. albicans* et sur la dissémination du champignon aux organes profonds. Des groupes de souris non-Tg non-infectés ont d'abord été utilisés afin de quantifier et d'évaluer la déplétion induite au niveau de la rate, de la muqueuse intestinale et de la muqueuse buccale par les liposomes contenant du clodronate selon différents protocoles d'administration. Cette évaluation a été effectuée en cytométrie en flux et en immunohistochimie (résultats non-présentés). Dans un premier temps, 3 groupes de 7 souris chacun ont reçu un volume de 200 μ L de liposomes-clodronate, de liposomes-PBS ou de PBS seul par injection dans la veine caudale. La déplétion a ensuite été évaluée en cytométrie en flux. Les résultats de cette première expérimentation sont présentés au Tableau III et démontrent une déplétion de plus de 50% des macrophages au niveau de la rate et de 3.5% au niveau de la muqueuse intestinale. La déplétion au niveau de la muqueuse buccale n'a pu être déterminée en cytométrie en flux puisque les témoins marqués avec les anticorps isotypiques étaient positifs à plus de 70 %. Aucune diminution du nombre de macrophages n'a été observée en immunohistochimie au niveau de la muqueuse buccale des animaux ayant reçu des injections de liposomes-clodronate par rapport aux groupes témoins (résultats non-présentés). Un second essai a donc été réalisé, cette fois en injectant un volume de 50 μ L directement au niveau de la muqueuse buccale (injection dans chacune des joues) en plus d'une application topique des liposomes-clodronate au niveau des joues et de l'injection de 200 μ L dans la veine caudale. La déplétion au niveau de la rate est supérieure à celle obtenue précédemment, cependant une forte déplétion est également obtenue chez le groupe témoin injecté au liposome-PBS. Aucune déplétion n'a toutefois été obtenue au niveau de la muqueuse buccale (Tableau III). Un troisième essai avec un schéma expérimental identique au précédent a été réalisé et a permis l'obtention de 39% de déplétion des macrophages à la muqueuse buccale. Cette déplétion est cependant considérée comme étant insuffisante à la détermination d'une variation significative de la charge buccale de *Candida albicans* et est

inférieure à la déplétion obtenue chez le groupe témoin ayant reçu des injections de liposomes-PBS, considéré comme un témoin négatif. Cette voie expérimentale a donc été abandonnée dans l'attente d'un produit dont l'administration à la muqueuse buccale serait plus efficace.

Tableau III: Évaluation de la déplétion des macrophages provenant de la rate, du petit-intestin et de la muqueuse buccale chez des souris non-Tg non-infectées (7 souris par groupe) suite à l'injection dans la veine caudale de 200 uL de liposomes-clodronate, de liposome-PBS ou de PBS (Essai 1) et à l'injection intra-jugale et à l'application topique de 50 uL de ces mêmes produits (Essais 2 et 3).

		Rate		Petit-intestin		Muqueuse buccale	
		% mΦ	% déplétion	%mΦ	% déplétion	% mΦ	% déplétion
	PBS	8.4	-	11.9	-	ND	ND
Essai 1	Liposome-PBS	8.7	-	11.7	1.4%	ND	ND
	Liposome-clodronate	3.8	54%	11.4	3.5%	ND	ND
	PBS	6.7	-	ND	ND	4.5	-
Essai 2	Liposome PBS	2.2	67,7%	ND	ND	7.8	0%
	Liposome clodronate	1.5	78,1%	ND	ND	5.6	0%
	PBS	12.2	-	3.2	-	31.9	-
Essai 3	Liposome PBS	ND	ND	5.5	0%	12.8	59.9%
	Liposome clodronate	4.3	64.5%	5.6	0%	19.4	39.1%

ND : Non déterminé

Discussion

La souris transgénique CD4C/HIV^{MutA} exprimant les gènes *rev*, *env* et *nef* du VIH-1 et décrite dans ce mémoire présente une maladie reproduisant les manifestations cliniques observées chez les patients infectés au VIH-1, telles qu'une atrophie sévère des organes lymphoïdes accompagnée de fibrose, une déplétion des lymphocytes T CD4 ainsi qu'une mort prématurée. Les souris CD4C/HIV^{MutA} utilisées au cours des différentes expérimentations développent un état de porteur chronique de *C. albicans* au niveau de la muqueuse buccale suite à l'inoculation du champignon à la cavité orale, tel qu'observé antérieurement (de Repentigny, Aumont et al. 2002). La charge buccale du champignon demeure faible au cours de la progression de la maladie pour augmenter drastiquement à la phase pré-mortem, correspondant à la phase SIDA chez notre modèle murin (figure 7) (de Repentigny, Aumont et al. 2002), ce qui reproduit fidèlement l'évolution observée chez les patients séropositifs atteints d'une COP. Cette infection chronique de la muqueuse buccale est toutefois très rarement associée à la dissémination de *C. albicans* aux organes profonds, ce qui est également conforme aux observations chez les patients séropositifs. Pour leur part, les animaux non-Tg, dont le système immunitaire est intact, éliminent le champignon de la cavité buccale peu après la primo-infection. De façon identique à la COP chez l'homme, la pénétration des hyphes de *Candida* est limitée à la couche superficielle de l'épithélium de la muqueuse buccale chez les souris Tg et est accompagnée de l'infiltration de cellules inflammatoires mononuclées (figure 9C et D) (de Repentigny, Aumont et al. 2002). Étant donné les similitudes existant entre la maladie induite par le transgène chez la souris et celle induite par l'infection au VIH-1 chez l'homme, ces animaux représentent un modèle pertinent pour l'étude des altérations du système immunitaire sous-tendant l'établissement d'une COP.

Tel que mentionné précédemment, les hyphes de *C. albicans* sont limitées à la couche superficielle de l'épithélium de la muqueuse buccale chez la souris Tg (figure 9C). Nous avons identifié en immunohistochimie les types cellulaires composant ces infiltrats de cellules mononuclées à la muqueuse buccale ainsi qu'à la muqueuse

gastrique (*cardial-atrium fold*). La muqueuse gastrique constitue une porte d'entrée de la candidose disséminée d'origine endogène chez la souris, qui toutefois ne survient pas chez la souris Tg infectées au *C. albicans*.

Les études immunohistochimiques effectuées au cours de ce projet de maîtrise n'ont pas permis d'observer la déplétion des cellules dendritiques à la muqueuse buccale et à la muqueuse gastrique des animaux Tg. Cette déplétion survient pourtant chez les patients séropositifs (Chou, Epstein et al. 2000) et des études effectuées antérieurement au laboratoire par cytométrie en flux et utilisant la muqueuse buccale et les ganglions cervicaux ont démontré la déplétion marquée des DCs matures alors que le nombre de DCs immatures demeurait inchangé (Lewandowski, Marquis et al. 2006). Cette distinction entre les DCs matures et immatures est rendue possible par les niveaux d'expression différentiels du marqueur de surface CD11b, fortement exprimé chez les DCs immatures et faiblement exprimé chez les DCs matures. Ce marqueur de surface étant également exprimé par les macrophages (Barbeau and Deslauriers 1989), l'anticorps anti-CD11c a plutôt été utilisé afin d'identifier les cellules dendritiques en immunohistochimie. L'expression de surface de ce marqueur étant semblable chez les DCs matures et immatures, leur distinction était impossible. Cependant, les DCs de patients séropositifs présentent un phénotype immature, caractérisé entre autres par le raccourcissement et l'arrondissement des dendrites (Romagnoli, Pimpinelli et al. 1997). Ce défaut de maturation des dendrites est aussi observé chez les DCs des animaux Tg, autant au niveau de la muqueuse buccale que de la muqueuse gastrique, alors que la morphologie des DCs des animaux non-Tg est normale (figures 9B et D). L'absence de déplétion des DCs observée dans cette étude peut donc être expliquée par l'anticorps utilisé pour les identifier. Les lymphocytes T CD4 et les lymphocytes T CD8 sont également déplétés chez les animaux Tg non-infectés par rapport à leurs témoins non-Tg, bien que la fréquence des lymphocytes T CD8 soit très peu élevée chez tous les groupes étudiés (figures 9B et D). Ceci confirme des résultats obtenus antérieurement au laboratoire par immunohistochimie et par cytométrie en flux (de Repentigny, Aumont et al. 2002; Lewandowski, Marquis et al. 2006; Marquis,

Lewandowski et al. 2006) et reproduit encore une fois les manifestations de l'infection au VIH-1 (Herbein, Mahlknecht et al. 1998; de Repentigny, Lewandowski et al. 2004).

Malgré les altérations du nombre et des fonctions des cellules dendritiques, des lymphocytes T CD4 et T CD8, ces cellules sont recrutées massivement à la muqueuse gastrique (figure 9B) et plus modestement à la muqueuse buccale en réponse à *C. albicans* (figure 9D) (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). L'augmentation du nombre de DCs, de lymphocytes T CD4 et de lymphocytes T CD8 en réponse à *C. albicans* avait déjà été observée à la muqueuse buccale des souris Tg par cytométrie en flux (de Repentigny, Aumont et al. 2002; Lewandowski, Marquis et al. 2006). L'immunohistochimie permet cependant de localiser ces cellules dans la muqueuse. Conformément à ce qui est décrit dans la littérature, les DCs sont localisées à la membrane basale et à la couche suprabasale de l'épithélium de la muqueuse buccale (Koch, Kohl et al. 2006), les lymphocytes T CD4 à la membrane basale et les lymphocytes T CD8 à l'interface compris entre la lamina propria et l'épithélium (van Loon, Krieg et al. 1989; Myers, Leigh et al. 2003), en réponse à *C. albicans* (figure 9D). Les mêmes résultats ont été obtenus à la muqueuse gastrique (figure 9B). Ceci démontre encore une fois que les mécanismes permettant le recrutement de ces cellules aux muqueuses en réponse au champignon sont inaltérés malgré la présence du transgène. Cependant, étant donné la pénétration des hyphes de *Candida* à la lamina propria et à la sous-muqueuse gastrique des souris Tg infectées (70 jours et pré-mortem respectivement), ces mêmes populations cellulaires sont incapables d'éliminer le champignon, malgré leur propriétés anti-*Candida*. Certaines de ces propriétés candidicides semblent toutefois conservées ou l'être suffisamment puisque le champignon demeure confiné à la muqueuse gastrique, même au stade avancé de la maladie (pré-mortem).

Des études effectuées antérieurement au laboratoire ont démontré que l'expression des gènes *rev*, *env* et *nef* par les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4 engendre des perturbations fonctionnelles chez ces cellules, permettant ainsi la

prolifération de *C. albicans* aux muqueuses (de Repentigny, Aumont et al. 2002; Lewandowski, Marquis et al. 2006). Les cellules dendritiques sont déplétées chez les souris Tg (de Repentigny, Aumont et al. 2002) et l'expression du CMH-II à la surface cellulaire est également diminuée, suggérant que l'expression du transgène par les cellules dendritiques entraîne un défaut de maturation et pourrait interférer avec leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes (Lewandowski, Marquis et al. 2006). Cette présentation des antigènes de *Candida* aux lymphocytes T CD4 par les DCs est centrale à l'instauration d'une réponse à médiation cellulaire protectrice envers le champignon. L'expression du transgène par les DCs induit aussi une diminution des niveaux d'expression d'IL-12, nécessaire à l'initiation d'une réponse protectrice Th1 (Lewandowski, Marquis et al. 2006). La présence du transgène entraîne la déplétion des lymphocytes T CD4 ainsi qu'une transition du phénotype protecteur Th1 vers un phénotype Th2 (de Repentigny, Aumont et al. 2002; Lewandowski, Marquis et al. 2006). Une étude effectuée au laboratoire a démontré la perte de capacité proliférative des lymphocytes T CD4 des animaux Tg en réponse à *C. albicans in vitro* (Lewandowski, Marquis et al. 2006). Ceci démontre une altération des voies de signalisation menant à l'activation des populations cellulaires susceptibles de contrer la prolifération du champignon et pourrait expliquer la progression du champignon aux muqueuses (figures 9A et C).

La modification du profil de sécrétion de cytokines des lymphocytes T CD4 engendrée par le transgène influence aussi les fonctions de populations cellulaires n'exprimant pas le transgène. C'est le cas des lymphocytes T CD8 également déplétés chez les animaux transgéniques mais tout de même recrutés aux muqueuses gastrique et buccale en réponse à *C. albicans* (figures 9B et D) (de Repentigny, Aumont et al. 2002; Marquis, Lewandowski et al. 2006). Ces lymphocytes sont toutefois situés à bonne distance du champignon (figures 9B et D). Les lymphocytes T CD8 activés à l'IL-2 ont la capacité de tuer les hyphes de *C. albicans* (Beno, Stover et al. 1995), cependant le pourcentage de lymphocytes T CD4 exprimant cette cytokine est diminué chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutA} (Lewandowski, Marquis et al. 2006). Il est possible que la déplétion des lymphocytes T CD8 favorise la

prolifération du champignon à la muqueuse buccale (Marquis, Lewandowski et al. 2006), puisque cette population cellulaire augmente les propriétés microbicides des macrophages et des PMNs via la production d'IFN- γ (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004).

Les résultats présentés à la figure 9A démontrent également le recrutement de polymorphonucléaires neutrophiles à la muqueuse gastrique, mais ces derniers sont absents à la muqueuse buccale (figure 9C). Une étude conduite au laboratoire a permis de déterminer que la déplétion des PMNs ne modifie en rien le phénotype de porteur chronique de *C. albicans* à la muqueuse buccale chez la souris Tg (Marquis, Lewandowski et al. 2006). Cependant, une redondance fonctionnelle impliquant les macrophages et les polymorphonucléaires pourrait expliquer ce résultat puisqu'un autre groupe a déjà démontré que la déplétion des polymorphonucléaires et/ou la déplétion des macrophages et des polymorphonucléaires favorise la candidose oro-gastrique et la dissémination du champignon aux organes profonds à partir de ce site chez la souris SCID (Jensen, Warner et al. 1993; Jensen, Warner et al. 1994). L'étude du rôle des macrophages dans le confinement de *C. albicans* aux muqueuses de la souris Tg a donc été amorcée.

Les macrophages, tout comme les cellules dendritiques et les lymphocytes T CD4, sont infectés par le VIH-1. Cependant, la population macrophagique n'est pas déplétée par l'infection au VIH, puisque le virus, via la protéine Nef, induit des perturbations fonctionnelles chez le macrophage en inhibant les voies transcriptionnelles menant à l'apoptose (Olivetta, Percario et al. 2003). Les résultats obtenus en immunohistochimie à l'aide de l'anticorps anti-F4/80 murin démontre que la population macrophagique de la muqueuse gastrique demeure constante chez la souris Tg au cours de la progression de la maladie (figure 9B). Cependant, une densité nettement inférieure de macrophages est présente à la muqueuse buccale comparativement à la muqueuse gastrique, peu importe le groupe observé (figure 9D), démontrant une variation de la densité des macrophages selon le site anatomique

(Gordon and Taylor 2005). Malgré une variation importante de la densité de macrophages à la cavité buccale elle-même (figure 9D), entre la muqueuse linguale et la muqueuse jugale, les macrophages ne semblent pas déplétés chez la souris CD4C/HIV^{MutA}. Ces résultats sont corroborés par une étude effectuée au laboratoire par cytométrie de flux à la muqueuse jugale et au petit intestin (Goupil, Trudelle et al. 2009) et reproduit la pathologie de l'infection au VIH-1 chez l'homme (Carter and Ehrlich 2008).

Les souris Tg conservent leur capacité à recruter les macrophages à la muqueuse gastrique et à la muqueuse buccale en réponse à *C. albicans* malgré l'expression du transgène (figures 9A et B). Le recrutement de macrophages en réponse à l'infection au *C. albicans* est également conservé chez des souris immunocompétentes (Chakir, Cote et al. 1994; Cole, Halawa et al. 1996) ou immunosupprimées, tels les souris RAG2^{-/-} (Coste, Lagane et al. 2008). Ces résultats sont parfaitement cohérents avec l'augmentation du nombre de monocytes circulant observée précédemment chez la souris Tg (Marquis, Lewandowski et al. 2006) et avec l'augmentation de l'expression des chimiokines CCL5 (RANTES), CCL2 (MCP-1) et CXCL10 (IP-10) à la muqueuse buccale de patients séropositifs atteints d'une COP (Lilly, Hart et al. 2004). Les chimiokines CCL5, CCL2 et CXCL10 sont responsables du recrutement des monocytes au site d'infection (Paul 2008). CCL2 augmente également la flambée oxydative des monocytes et la production de certaines cytokines inflammatoires (Aliberti, Machado et al. 1999), deux mécanismes conservés chez la souris CD4C/HIV^{MutA} (Goupil, Trudelle et al. 2009). La chimiokine CXCL10 est également responsable du recrutement des lymphocytes T CD4 et T CD8 activés au site d'inflammation (Lilly, Hart et al. 2004), un autre mécanisme inaltéré chez la souris CD4C/HIV^{MutA}. Pour sa part, CCL5 est produit par les lymphocytes T CD4, T CD8 et les monocytes et induit le recrutement des lymphocytes T, des cellules dendritiques et des monocytes (Huang and Levitz 2000), ce qui corrobore les résultats obtenus en immunohistochimie. La production de MIP-1 α , de MIP-1 β et de CCL5 *in vitro* par des cellules mononuclées du sang périphérique provenant de patients infectés au VIH-1 est également conservée en réponse à *C. albicans* (Huang and Levitz 2000) et

la production de MIP-1 α et MIP-1 β est conservée chez les patients séropositifs (Olivetta, Percario et al. 2003). Une autre étude suggère également que *C. albicans* produit un facteur chimio-attractant spécifique aux macrophages (Edens, Parkos et al. 1999). À la lumière des résultats obtenus en immunohistochimie, ces mécanismes de signalisation menant au recrutement des macrophages, des DCs, des lymphocytes T CD4 et T CD8 semblent conservés chez la souris CD4C/HIV^{MutA} infectée à *C. albicans*.

Étant donné que les macrophages sont présents au site d'infection chez la souris Tg CD4C/HIV^{MutA}, qu'ils possèdent de nombreuses propriétés anti-*Candida* mais que le champignon demeure présent aux muqueuses, nous avons voulu déterminer la proportion de macrophages d'activation classique (M1) et d'activation alternative (M2) aux muqueuses buccale et gastrique. La polarisation des macrophages vers un phénotype M1 ou M2 influence grandement la réponse produite envers le champignon puisque les macrophages M1 présentent une augmentation de leurs capacités microbicides (augmentation des capacités phagocytaires, de la production de NO via iNOS et la production de RIO) alors que les macrophages M2 sont plutôt anti-inflammatoires et participent à prévenir les dommages tissulaires induits par l'inflammation (Martinez, Sica et al. 2008).

Les résultats de la double immunofluorescence démontrent que les macrophages des souris CD4C/HIV^{MutA} infectées jusqu'à l'apparition des points limites présentent essentiellement un phénotype d'activation alternative, autant à la muqueuse buccale qu'à la muqueuse gastrique (figure 10). Des résultats similaires, mais qui ne sont pas présentés ici, ont été obtenus avec des souris Tg infectées 70 jours. Ces résultats ont également été confirmés par PCR en temps réel (Goupil, Trudelle et al. 2009).

Le phénotype d'activation alternative des macrophages présent aux muqueuses est conforme à des études effectuées antérieurement au laboratoire ayant démontré que le transgène engendre une transition du profil d'expression de cytokines Th1 vers un profil Th2 chez les lymphocytes T CD4 contenus dans les ganglions cervicaux de souris CD4C/HIV^{MutA} après 70 jours d'infection (Lewandowski, Marquis et al.

2006). Le pourcentage de lymphocytes T CD4 produisant de l'IFN- γ était significativement diminué chez ces animaux Tg après 70 jours d'infection par rapport aux animaux non-Tg, alors que le pourcentage de lymphocytes T CD4 sécrétant de l'IL-4 était significativement augmenté (Lewandowski, Marquis et al. 2006). Bien que les macrophages M2 semblent associés à une susceptibilité accrue aux pathogènes intracellulaires (Kropf, Fuentes et al. 2005; Muller, Stenzel et al. 2007; Weng, Huntley et al. 2007) (Holscher, Arendse et al. 2006), une étude réalisée par Coste & al. (Coste, Lagane et al. 2008) a permis de démontrer une réduction de la sévérité de la candidose oro-gastrique chez la souris RAG2^{-/-} par un traitement à l'IL-13. Ces souris RAG2^{-/-} sont incapables de générer des immunoglobulines et des récepteurs de cellules T fonctionnels, causant une absence de lymphocytes T et B matures. Ces souris sont donc susceptibles à la candidose oro-gastrique, mais demeurent résistantes à la candidose disséminée, probablement par l'activité microbicide inaltérée des polymorphonucléaires neutrophiles et des macrophages (Coste, Lagane et al. 2008). Ces animaux conservent d'ailleurs leur capacité à recruter des macrophages au site d'infection et les capacités phagocytaires de ces macrophages sont augmentées, probablement via la surexpression du récepteur du mannose (CD206) induite par le traitement à l'IL-13 (Coste, Linas et al. 2002). Il est possible que le même phénomène survienne chez nos souris Tg pré-mortem ou infectées 70 jours puisque le champignon est confiné à la muqueuse gastrique et que les capacités phagocytaires des macrophages péritonéaux de souris Tg infectés 70 jours sont augmentées (Goupil, Trudelle et al. 2009).

Plusieurs études suggèrent aussi que la polarisation des macrophages vers un phénotype d'activation classique ou alternative exerce une influence sur l'expression des récepteurs de chimiokine et sur la production de celles-ci, et par conséquent sur le recrutement de cellules inflammatoires au site d'infection (Mantovani, Sica et al. 2004). L'IL-4 et l'IL-10 diminuent l'expression de CXCL10 et de CCL5 en inhibant la phosphorylation de STAT-1, diminuant ainsi le recrutement de monocytes et de lymphocytes T CD4 et CD8 activés au site d'infection (Mantovani, Sica et al. 2004). Cette activité immunosuppressive pourrait avoir pour effet d'atténuer l'importance de

la réponse inflammatoire engendrée par l'invasion du champignon, ce qui constitue l'une des principales fonctions des macrophages M2 (Martinez, Sica et al. 2008). La production d'IL-10 est également augmentée chez la souris CD4C/HIV^{MutA} et cette augmentation est supérieure chez les animaux Tg infectés (Lewandowski, Marquis et al. 2006). Il est donc possible que les macrophages M2 présents au site d'infection puissent participer au confinement du champignon à la muqueuse gastrique par l'augmentation de leurs capacités phagocytaires mais que ces dernières soient insuffisantes à éliminer *Candida*, étant donné la diminution des capacités microbicides induite par le phénotype M2 et l'atténuation de la réponse inflammatoire engendrée.

La production de monoxyde d'azote via l'enzyme iNOS est une propriété microbicide majeure des macrophages et a été impliquée dans la résistance de souris SCID à la candidose gastrique (Vazquez-Torres and Balish 1997). Puisque ces souris présentent également une altération des fonctions des lymphocytes T, nous avons évalué l'effet de la production de monoxyde d'azote sur la charge buccale de *C. albicans* ainsi que sur la dissémination du champignon aux organes profonds chez les souris Tg.

Les animaux CD4C/HIV^{MutG} homozygotes et hétérozygotes pour le gène *NOS2* présentent un état de porteur chronique semblable à celui observé chez la souris CD4C/HIV^{MutG} ^{+/+} étudiée antérieurement (Marquis, Lewandowski et al. 2006). Aucune variation significative ($p > 0.05$) de la charge buccale de *C. albicans* n'a été observée entre les animaux Tg homozygotes et hétérozygotes et le champignon est demeuré confiné à la muqueuse du tractus gastro-intestinal (Tableau II), bien que la production de NO par les macrophages péritonéaux d'animaux Tg *NOS2*^{-/-} soit pratiquement nulle et réduite de 50 % chez les animaux Tg *NOS2*^{+/-} (figure 13). Ces résultats suggèrent que la production de NO par les macrophages n'est pas essentielle à limiter la prolifération de *C. albicans* à la muqueuse buccale ni à prévenir la dissémination du champignon aux organes profonds à partir du *cardial-atrium fold*.

Des résultats comparables ont été obtenus par Ashman et al (Farah, Saunus et al. 2009) chez des souris immunocompétentes, démontrant ainsi que la production de monoxyde d'azote ne devient pas pour autant essentielle chez la souris immunodéficiente CD4C/HIV^{MutG}.

Le phénotype de porteur chronique de *C. albicans* induit par l'infection expérimentale de ces animaux Tg CD4C/HIV^{MutG} homozygotes et hétérozygotes pour l'expression de *NOS2* est similaire à celui observé chez la souris CD4C/HIV^{MutA}, dont l'expression de *NOS2* est normale (figure 12A). Une étude menée au laboratoire a démontré que le transgène n'altère pas la production de NO par les macrophages péritonéaux des souris Tg CD4C/HIV^{MutA} (Goupil, Trudelle et al. 2009). Cependant, il est possible que la modulation de l'expression de certaines cytokines par le transgène inhibe la production de NO chez la souris CD4C/HIV^{MutA} puisque les niveaux d'expression d'IL-4 et d'IL-10 sont augmentés chez ces dernières (Lewandowski, Marquis et al. 2006) et que ces deux cytokines inhibent l'action de iNOS (Martinez, Sica et al. 2008). Ceci est parfaitement conséquent avec le phénotype d'activation alternative des macrophages présents aux muqueuses buccales et gastriques de la souris CD4C/HIV^{MutA} pré-mortem, puisque l'enzyme iNOS est inhibée chez les macrophages M2 (Martinez, Sica et al. 2008). Les niveaux d'expression d'IL-4 et d'IL-10 n'ont cependant pas été évalués lors de la présente étude chez la souris CD4C/HIV^{MutG}. L'évaluation parallèle de la charge buccale de *C. albicans* chez une lignée de souris CD4C/HIV^{MutA} déficiente pour l'expression de *NOS2* aurait également été pertinente. Cette lignée n'était cependant pas disponible puisque les animaux Tg portant des mutations sont générées au laboratoire du Dr Jolicoeur, qui travaille principalement avec des animaux CD4C/HIV^{MutG}.

Il aurait également été pertinent de dépléter un certain nombre de souris Tg *NOS2*^{-/-} et *NOS2*^{+/-} en polymorphonucléaires neutrophiles à l'aide d'anticorps monoclonaux (Marquis, Lewandowski et al. 2006) afin de déterminer si, comme chez la souris SCID (Jensen, Warner et al. 1993; Jensen, Warner et al. 1994), la déplétion des PMNs couplée à une altération des fonctions des macrophages aurait permis la

dissémination du champignon aux organes profonds chez la souris Tg. Une étude menée antérieurement au laboratoire a démontré que les polymorphonucléaires neutrophiles, qui produisent également du NO via l'enzyme iNOS, sont indispensables à la protection contre la candidose chez la souris CD4C/HIV^{MutA} (Marquis, Lewandowski et al. 2006). Il est possible que les mécanismes fongicides des PMNs aient compensé la perte de fonction des macrophages dans la présente étude. Ces expérimentations n'ont toutefois pu être réalisées puisque nous disposions d'un nombre restreint d'animaux Tg et que ces derniers sont décédés prématurément.

Les taux de mortalité des animaux Tg CD4C/HIV^{MutG} *NOS2*^{+/-} et *NOS2*^{-/-} ne sont pas significativement différents ($p= 0.66$) (figure 12B). Les animaux Tg *NOS2*^{+/-} et *NOS2*^{-/-} présentent 50 % de survie après 76 et 89 jours respectivement (figure 12A) alors la totalité des animaux non-Tg homozygotes et hétérozygotes ont survécu à la durée de l'expérimentation (figure 12B). Le décès prématuré des animaux Tg ne peut donc être imputé uniquement à la mutation du gène *NOS2*. Il semble toutefois que la dysfonction partielle ou complète de ce gène intensifie la progression de la maladie causée par l'expression de *nef* seule.

La meilleure façon d'évaluer l'implication d'une population cellulaire dans un phénomène biologique demeure l'élimination de cette dernière. Plusieurs essais de déplétion des macrophages ont été tentés au laboratoire, en utilisant différents produits. L'injection intraveineuse de liposomes contenant du clodronate constitue aujourd'hui la procédure la plus largement utilisée afin de dépléter de petits animaux de laboratoire en macrophages. Ces derniers phagocytent les liposomes qui libèrent le clodronate dans le milieu intracellulaire et son accumulation produit des dommages métaboliques irréversibles conduisant à l'apoptose du macrophage (Van Rooijen and Sanders 1994). Ces liposomes contenant du clodronate ont entre autres permis la déplétion des macrophages de la rate, des poumons, du foie et des intestins (Thepen, Van Rooijen et al. 1989; van Rooijen, Kors et al. 1989; Van Rooijen, Kors et al. 1990; Camilleri, Williams et al. 1995; Galeazzi, Haapala et al. 2000). Cependant, une combinaison d'injections intraveineuses au niveau de la queue, d'injections au niveau

de la muqueuse jugale et d'application topique de liposomes-clodronate au niveau de la joue n'ont pas permis une déplétion suffisante des macrophages de la muqueuse buccale (Tableau III). Il est possible que les liposomes-clodronate injectés dans la veine caudale ne puissent se rendre jusqu'à la muqueuse buccale parce qu'ils sont rapidement phagocytés par les macrophages spléniques et les cellules de Kupffer du foie. Une étude a démontré que 90 % des liposomes injectés par voie intraveineuse sont éliminés de la circulation après deux heures et que 25 % d'entre eux sont accumulés au niveau du foie alors que 15 % le sont au niveau de la rate (van Rooijen and van Kesteren-Hendrikx 2002). Il est aussi probable que l'injection répétée de liposomes au niveau des joues cause une inflammation qui pourrait induire le recrutement de macrophages au niveau de la muqueuse, empêchant ainsi une déplétion suffisante des macrophages. La déplétion de cette population cellulaire par l'utilisation de liposomes contenant du clodronate a donc été abandonnée. La génération de souris Tg déficientes en macrophages demeure l'alternative la plus susceptible de permettre l'évaluation du rôle des macrophages dans la protection envers la COP.

En conclusion, cette étude a permis de démontrer que les cellules dendritiques, les lymphocytes T CD4, les lymphocytes T CD8 et les macrophages sont recrutés aux muqueuses buccale et gastrique des souris CD4C/HIV^{MutA} en réponse à *C. albicans* et que ces macrophages présentent majoritairement un phénotype d'activation alternative. La production de NO par les macrophages n'est pas nécessaire à limiter la prolifération de *C. albicans* à la muqueuse buccale ni à prévenir la dissémination du champignon aux organes profonds. Ces résultats confirment que les altérations du nombre et des fonctions des lymphocytes T CD4 par l'expression du transgène jouent un rôle central dans l'établissement des perturbations de l'immunité chez la souris Tg menant à la colonisation de la cavité orale et du tractus gastro-intestinal par *C. albicans*. Les altérations du nombre et des fonctions des DCs induites par l'expression des protéines virales rev, env et nef ont

été démontrées antérieurement chez ces souris (Lewandowski, Marquis et al. 2006), tout comme l'importance des lymphocytes T CD8 dans la limitation de la prolifération du champignon à la muqueuse buccale (Marquis, Lewandowski et al. 2006). Ces observations ont également été effectuées chez des patients séropositifs et justifient l'utilisation de ce modèle murin dans l'étude des altérations du système immunitaires sous-tendant l'établissement de la candidose oropharyngée et la colonisation du système digestif par *C. albicans*. Puisque la réponse des macrophages envers ce pathogène est préservée chez notre modèle murin bien que le phénotype M2 prédomine, ces derniers ne semblent pas directement responsables de l'établissement de l'infection chronique à *Candida* et semblent conserver certaines capacités permettant de contrer la dissémination du champignon. Il est possible que la susceptibilité de la souris CD4C/HIV^{MutA} à la candidose oropharyngée soit due en partie à une altération des fonctions des kératinocytes. Ces cellules sont les premières à entrer en contact avec le champignon et possèdent de nombreuses propriétés candidocides, dont la production de NO via l'enzyme iNOS, la sécrétion de peptides antimicrobiens, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires pouvant influencer d'autres types cellulaires présents à la muqueuse et la sécrétion de chimiokines permettant le recrutement de cellules mononuclées au site d'infection. Il est possible que ces mécanismes soient altérés par l'influence indirecte du transgène, puisque ces cellules ne l'expriment pas. Des études du rôle des kératinocytes dans la protection envers la candidose oropharyngée devraient être amorcées chez la souris transgénique exprimant le génome tronqué du VIH-1.

Bibliographies :

Livres de référence

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

Hould, R. (1982). Histologie descriptive. Montréal, Décarie Éditeur

Janeway, C. and P. Travers (2008). Immunobiology : the immune system in health and disease. New York, Current Biology ; Garland Pub

Maronpot, R. & al. (1999). Pathology of the mouse: Reference and atlas. Vienna, IL, Cache River Press.

Nanci, A. and A. R. Ten Cate (2003). Ten Cate's oral histology : development, structure, and function. St. Louis, Mosby.

Paul, W. E. (2008). Fundamental immunology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.

Provenza, V.D. (1988). Fundamentals of oral histology and embryology. Philadelphia, Lea & Febiger.

Schroeder, H. E. (1991). Oral structural biology. New York, N.Y., Thieme Medical Publishers, Inc.

Weiss, L. (1984). Modern concepts of gastrointestinal histology. New York, Elsevier Publication.

Articles scientifiques

(1993). "Classification and diagnostic criteria for oral lesions in HIV infection. EC-Clearinghouse on Oral Problems Related to HIV Infection and WHO Collaborating Centre on Oral Manifestations of the Immunodeficiency Virus." *J Oral Pathol Med* 22(7): 289-91.

Acosta-Rodriguez, E. V., L. Rivino, et al. (2007). "Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells." *Nat Immunol* 8(6): 639-46.

Adurogbangba, 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.

Alexaki, A., Y. Liu, et al. (2008). "Cellular reservoirs of HIV-1 and their role in viral persistence." *Curr HIV Res* 6(5): 388-400.

Aliberti, J. C., F. S. Machado, et al. (1999). "beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbiostatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*." *Infect Immun* 67(9): 4819-26.

- 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.
- Bacci, A., C. Montagnoli, et al. (2002). "Dendritic cells pulsed with fungal RNA induce protective immunity to *Candida albicans* in hematopoietic transplantation." *J Immunol* 168(6): 2904-13.
- 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.
- Balish, E., T. Warner, et al. (2001). "Oroesophageal candidiasis is lethal for transgenic mice with combined natural killer and T-cell defects." *Med Mycol* 39(3): 261-8.
- Banchereau, J., F. Briere, et al. (2000). "Immunobiology of dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 18: 767-811.
- Bandres, J. C., J. Trial, et al. (1993). "Increased phagocytosis and generation of reactive oxygen products by neutrophils and monocytes of men with stage 1 human immunodeficiency virus infection." *J Infect Dis* 168(1): 75-83.
- Barbeau, J. and N. Deslauriers (1989). "Phenotypic and functional analysis of oral mucosal macrophages." *Reg Immunol* 2(5): 285-93.
- Bard, E., S. Laibe, et al. (2002). "Nonspecific secretory immunity in HIV-infected patients with oral candidiasis." *J Acquir Immune Defic Syndr* 31(3): 276-84.
- Barnett, J. A. (2008). "A history of research on yeasts 12: medical yeasts part 1, *Candida albicans*." *Yeast* 25(6): 385-417.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, et al. (1983). "Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS)." *Science* 220(4599): 868-71.
- Benichou, S., L. X. Liu, et al. (1997). "Use of the two-hybrid system to identify cellular partners of the HIV1 Nef protein." *Res Virol* 148(1): 71-3.
- 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* 38(10): 1632-6.
- Berger, E. A., R. W. Doms, et al. (1998). "A new classification for HIV-1." *Nature* 391(6664): 240.
- Bi, X., Y. Suzuki, et al. (2009). "High frequency and proliferation of CD4+ FOXP3+ Treg in HIV-1-infected patients with low CD4 counts." *Eur J Immunol* 39(1): 301-9.
- Bolduc, C., J. D. Waterfield, et al. (1990). "Tissue distribution and cytofluorometric analysis of oral mucosal T cells in the BALB/c mouse." *Res Immunol* 141(6): 461-75.
- 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.
- Borman, A. M., R. Petch, et al. (2008). "*Candida nivariensis*, an emerging pathogenic fungus with multidrug resistance to antifungal agents." *J Clin Microbiol* 46(3): 933-8.
- Borrow, P., H. Lewicki, et al. (1994). "Virus-specific CD8+ cytotoxic T-lymphocyte activity associated with control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 infection." *J Virol* 68(9): 6103-10.
- Bromuro, C., A. Torosantucci, et al. (2002). "Interplay between protective and inhibitory antibodies dictates the outcome of experimentally disseminated Candidiasis in recipients of a *Candida albicans* vaccine." *Infect Immun* 70(10): 5462-70.
- Brown, A. J., F. C. Odds, et al. (2007). "Infection-related gene expression in *Candida albicans*." *Curr Opin Microbiol* 10(4): 307-13.

- 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.
- Cambi, A., M. G. Netea, et al. (2008). "Dendritic cell interaction with *Candida albicans* critically depends on N-linked mannan." *J Biol Chem* 283(29): 20590-9.
- Camilleri, J. P., A. S. Williams, et al. (1995). "Methods for assessing splenic macrophage depletion by liposome encapsulated clodronate." *Inflamm Res* 44(4): 152-7.
- Cantorna, M. T. and E. Balish (1990). "Mucosal and systemic candidiasis in congenitally immunodeficient mice." *Infect Immun* 58(4): 1093-100.
- Cao, W., B. D. Jamieson, et al. (2009). "Regulatory T cell expansion and immune activation during untreated HIV type 1 infection are associated with disease progression." *AIDS Res Hum Retroviruses* 25(2): 183-91.
- Carter, C. A. and L. S. Ehrlich (2008). "Cell biology of HIV-1 infection of macrophages." *Annu Rev Microbiol* 62: 425-43.
- Cavrois, M., J. Neidleman, et al. (2008). "The achilles heel of the trojan horse model of HIV-1 trans-infection." *PLoS Pathog* 4(6): e1000051.
- Chai, L. Y., M. G. Netea, et al. (2008). "Fungal strategies for overcoming host innate immune response." *Med Mycol*: 1-10.
- Chakir, J., L. Cote, et al. (1994). "Differential pattern of infection and immune response during experimental oral candidiasis in BALB/c and DBA/2 (H-2d) mice." *Oral Microbiol Immunol* 9(2): 88-94.
- Challacombe, S. J. (1994). "Immunologic aspects of oral candidiasis." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 78(2): 202-10.
- Challacombe, S. J. and J. R. Naglik (2006). "The effects of HIV infection on oral mucosal immunity." *Adv Dent Res* 19(1): 29-35.
- 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.
- Chow, J. K., Y. Golan, et al. (2008). "Factors associated with candidemia caused by non-*albicans* *Candida* species versus *Candida albicans* in the intensive care unit." *Clin Infect Dis* 46(8): 1206-13.
- Clark, S. J., M. S. Saag, et al. (1991). "High titers of cytopathic virus in plasma of patients with symptomatic primary HIV-1 infection." *N Engl J Med* 324(14): 954-60.
- Cohen, E. A., R. A. Subbramanian, et al. (1996). "Role of auxiliary proteins in retroviral morphogenesis." *Curr Top Microbiol Immunol* 214: 219-35.
- Cole, G. T., A. A. Halawa, et al. (1996). "The role of the gastrointestinal tract in hematogenous candidiasis: from the laboratory to the bedside." *Clin Infect Dis* 22 Suppl 2: S73-88.
- Connor, R. I., K. E. Sheridan, et al. (1997). "Change in coreceptor use correlates with disease progression in HIV-1--infected individuals." *J Exp Med* 185(4): 621-8.
- Conti, H. R., F. Shen, et al. (2009). "Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis." *J Exp Med* 206(2): 299-311.
- Coogan, M. M., S. P. Sweet, et al. (1994). "Immunoglobulin A (IgA), IgA1, and IgA2 antibodies to *Candida albicans* in whole and parotid saliva in human immunodeficiency virus infection and AIDS." *Infect Immun* 62(3): 892-6.
- Cooper, D. A., J. Gold, et al. (1985). "Acute AIDS retrovirus infection. Definition of a clinical illness associated with seroconversion." *Lancet* 1(8428): 537-40.

- Coste, A., C. Lagane, et al. (2008). "IL-13 attenuates gastrointestinal candidiasis in normal and immunodeficient RAG-2(-/-) mice via peroxisome proliferator-activated receptor-gamma activation." *J Immunol* 180(7): 4939-47.
- Coste, A., M. D. Linas, et al. (2002). "A sub-inhibitory concentration of amphotericin B enhances candidastatic activity of interferon-gamma- and interleukin-13-treated murine peritoneal macrophages." *J Antimicrob Chemother* 49(5): 731-40.
- 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.
- d'Ostiani, C. F., G. Del Sero, et al. (2000). "Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo." *J Exp Med* 191(10): 1661-74.
- Daar, E. S., T. Moudgil, et al. (1991). "Transient high levels of viremia in patients with primary human immunodeficiency virus type 1 infection." *N Engl J Med* 324(14): 961-4.
- Dale, B. A. and L. P. Fredericks (2005). "Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease." *Curr Issues Mol Biol* 7(2): 119-33.
- De Leval, L., S. Debrus, et al. (1999). "Mice transgenic for a soluble form of murine cytotoxic T lymphocyte antigen 4 are refractory to murine acquired immune deficiency syndrome development." *Immunology* 98(4): 630-8.
- 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 Repentigny, L., M. Phaneuf, et al. (1992). "Gastrointestinal colonization and systemic dissemination by *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in intact and immunocompromised mice." *Infect Immun* 60(11): 4907-14.
- 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.
- Deslauriers, N., C. Coulombe, et al. (1995). "Topical application of a corticosteroid destabilizes the host-parasite relationship in an experimental model of the oral carrier state of *Candida albicans*." *FEMS Immunol Med Microbiol* 11(1): 45-55.
- 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.

- Dunsche, A., Y. Acil, et al. (2002). "The novel human beta-defensin-3 is widely expressed in oral tissues." *Eur J Oral Sci* 110(2): 121-4.
- Dunsche, A., Y. Acil, et al. (2001). "Expression profile of human defensins and antimicrobial proteins in oral tissues." *J Oral Pathol Med* 30(3): 154-8.
- Edens, H. A., C. A. Parkos, et al. (1999). "Non-serum-dependent chemotactic factors produced by *Candida albicans* stimulate chemotaxis by binding to the formyl peptide receptor on neutrophils and to an unknown receptor on macrophages." *Infect Immun* 67(3): 1063-71.
- Edgerton, M. and S. E. Koshlukova (2000). "Salivary histatin 5 and its similarities to the other antimicrobial proteins in human saliva." *Adv Dent Res* 14: 16-21.
- Ellis, M., S. Gupta, et al. (1988). "Impaired neutrophil function in patients with AIDS or AIDS-related complex: a comprehensive evaluation." *J Infect Dis* 158(6): 1268-76.
- Emerman, M. (1996). "HIV-1, Vpr and the cell cycle." *Curr Biol* 6(9): 1096-103.
- Epstein, J. B., P. J. Hancock, et al. (2003). "Oral candidiasis in hematopoietic cell transplantation patients: an outcome-based analysis." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 96(2): 154-63.
- 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.
- Eversole, L. R., K. T. Miyasaki, et al. (1993). "Keratinocyte expression of calprotectin in oral inflammatory mucosal diseases." *J Oral Pathol Med* 22(7): 303-7.
- Eversole, L. R., P. A. Reichart, et al. (1997). "Oral keratinocyte immune responses in HIV-associated candidiasis." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 84(4): 372-80.
- Farah, C. S., R. B. Ashman, et al. (2000). "Oral candidosis." *Clin Dermatol* 18(5): 553-62.
- 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.
- Farah, C. S., S. Hong, et al. (2001). "Irradiation-induced oral candidiasis in an experimental murine model." *Oral Microbiol Immunol* 16(6): 358-63.
- Farah, C. S., J. M. Saunus, et al. (2009). "Gene targeting demonstrates that inducible nitric oxide synthase is not essential for resistance to oral candidiasis in mice, or for killing of *Candida albicans* by macrophages in vitro." *Oral Microbiol Immunol* 24(1): 83-8.
- Fauci, A. S. (1993). "Multifactorial nature of human immunodeficiency virus disease: implications for therapy." *Science* 262(5136): 1011-8.
- Federico, M., Z. Percario, et al. (2001). "HIV-1 Nef activates STAT1 in human monocytes/macrophages through the release of soluble factors." *Blood* 98(9): 2752-61.
- Fidel, P. L., Jr. (2002). "Immunity to *Candida*." *Oral Dis* 8 Suppl 2: 69-75.
- Fidel, P. L., Jr. (2006). "Candida-host interactions in HIV disease: relationships in oropharyngeal candidiasis." *Adv Dent Res* 19(1): 80-4.
- Fidel, P. L., Jr., J. A. Vazquez, et al. (1999). "*Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*." *Clin Microbiol Rev* 12(1): 80-96.
- Frankel, A. D. and J. A. Young (1998). "HIV-1: fifteen proteins and an RNA." *Annu Rev Biochem* 67: 1-25.
- Fraser, I. P., H. Koziel, et al. (1998). "The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity." *Semin Immunol* 10(5): 363-72.

- Galeazzi, F., E. M. Haapala, et al. (2000). "Inflammation-induced impairment of enteric nerve function in nematode-infected mice is macrophage dependent." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 278(2): G259-65.
- Gallo, R. C., S. Z. Salahuddin, et al. (1984). "Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS." *Science* 224(4648): 500-3.
- Glick, M. and M. A. Siegel (1999). "Viral and fungal infections of the oral cavity in immunocompetent patients." *Infect Dis Clin North Am* 13(4): 817-31, vi.
- Gordon, S. and P. R. Taylor (2005). "Monocyte and macrophage heterogeneity." *Nat Rev Immunol* 5(12): 953-64.
- Goupil, M., E. B. Trudelle, et al. (2009). "Macrophage-mediated responses to *Candida albicans* in mice expressing the human immunodeficiency virus type 1 transgene." *Infect Immun* 77(9): 4136-49.
- Graziosi, C., G. Pantaleo, et al. (1993). "Kinetics of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) DNA and RNA synthesis during primary HIV-1 infection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(14): 6405-9.
- Greenspan, J. S., C. E. Barr, et al. (1992). "Oral manifestations of HIV infection. Definitions, diagnostic criteria, and principles of therapy. The U.S.A. Oral AIDS Collaborative Group." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 73(2): 142-4.
- Grone, A. (2002). "Keratinocytes and cytokines." *Vet Immunol Immunopathol* 88(1-2): 1-12.
- Guentzel, M. N. and C. Herrera (1982). "Effects of compromising agents on candidosis in mice with persistent infections initiated in infancy." *Infect Immun* 35(1): 222-8.
- 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.
- Henrard, D. R., E. Daar, et al. (1995). "Virologic and immunologic characterization of symptomatic and asymptomatic primary HIV-1 infection." *J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 9(3): 305-10.
- Herbein, G., U. Mählkecht, 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.
- Hill, M. W., J. H. Berg, et al. (1981). "Quantitative evaluation of regional differences between epithelia in the adult mouse." *Arch Oral Biol* 26(12): 1063-7.
- Holscher, C., B. Arendse, et al. (2006). "Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice." *J Immunol* 176(2): 1115-21.
- Hope, T. J. (1997). "Viral RNA export." *Chem Biol* 4(5): 335-44.
- 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., C. B. Green, et al. (2008). "Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit." *Med Mycol* 46(1): 1-15.
- Huang, C. and S. M. Levitz (2000). "Stimulation of macrophage inflammatory protein-1alpha, macrophage inflammatory protein-1beta, and RANTES by *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* in peripheral blood mononuclear cells from persons with and without human immunodeficiency virus infection." *J Infect Dis* 181(2): 791-4.

- Hull, C. M., R. M. Raisner, et al. (2000). "Evidence for mating of the "asexual" yeast *Candida albicans* in a mammalian host." *Science* 289(5477): 307-10.
- 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.
- Iwasaki, A. (2007). "Mucosal dendritic cells." *Annu Rev Immunol* 25: 381-418.
- 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.
- Jensen, J., T. Warner, et al. (1994). "The role of phagocytic cells in resistance to disseminated candidiasis in granulocytopenic mice." *J Infect Dis* 170(4): 900-5.
- Ji, J. and M. W. Cloyd (2009). "HIV-1 binding to CD4 on CD4+CD25+ regulatory T cells enhances their suppressive function and induces them to home to, and accumulate in, peripheral and mucosal lymphoid tissues: an additional mechanism of immunosuppression." *Int Immunol* 21(3): 283-94.
- 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.
- Jones-Carson, J., A. Vazquez-Torres, et al. (2000). "Disparate requirement for T cells in resistance to mucosal and acute systemic candidiasis." *Infect Immun* 68(4): 2363-5.
- Jones, K. A. and B. M. Peterlin (1994). "Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter." *Annu Rev Biochem* 63: 717-43.
- Kamai, Y., M. Kubota, et al. (2001). "New model of oropharyngeal candidiasis in mice." *Antimicrob Agents Chemother* 45(11): 3195-7.
- Kamai, Y., M. Kubota, et al. (2002). "Contribution of *Candida albicans* ALS1 to the pathogenesis of experimental oropharyngeal candidiasis." *Infect Immun* 70(9): 5256-8.
- Kedzierska, K. and S. M. Crowe (2001). "Cytokines and HIV-1: interactions and clinical implications." *Antivir Chem Chemother* 12(3): 133-50.
- 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. and S. Patterson (1997). "Bone marrow-derived dendritic cells, infection with human immunodeficiency virus, and immunopathology." *Annu Rev Immunol* 15: 593-615.
- 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.
- Koup, R. A., J. T. Safrit, et al. (1994). "Temporal association of cellular immune responses with the initial control of viremia in primary human immunodeficiency virus type 1 syndrome." *J Virol* 68(7): 4650-5.
- Krogstad, P. (2003). "Molecular biology of the human immunodeficiency virus: current and future targets for intervention." *Semin Pediatr Infect Dis* 14(4): 258-68.
- Kropf, P., J. M. Fuentes, et al. (2005). "Arginase and polyamine synthesis are key factors in the regulation of experimental leishmaniasis in vivo." *FASEB J* 19(8): 1000-2.
- Kruppa, M. (2008). "Quorum sensing and *Candida albicans*." *Mycoses*.

- Kumamoto, C. A. and M. D. Vences (2005). "Contributions of hyphae and hypha-co-regulated genes to *Candida albicans* virulence." *Cell Microbiol* 7(11): 1546-54.
- 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.
- Lai, L., N. Alaverdi, et al. (1998). "Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping." *J Immunol* 160(8): 3861-8.
- Laible, N. J. and G. R. Germaine (1985). "Bactericidal activity of human lysozyme, muramidase-inactive lysozyme, and cationic polypeptides against *Streptococcus sanguis* and *Streptococcus faecalis*: inhibition by chitin oligosaccharides." *Infect Immun* 48(3): 720-8.
- Lamb, R. A. and L. H. Pinto (1997). "Do Vpu and Vpr of human immunodeficiency virus type 1 and NB of influenza B virus have ion channel activities in the viral life cycles?" *Virology* 229(1): 1-11.
- Le Gall, S., J. M. Heard, et al. (1997). "Analysis of Nef-induced MHC-I endocytosis." *Res Virol* 148(1): 43-7.
- Leigh, J. E., K. Shetty, et al. (2004). "Oral opportunistic infections in HIV-positive individuals: review and role of mucosal immunity." *AIDS Patient Care STDS* 18(8): 443-56.
- Lenander-Lumikari, M. (1992). "Inhibition of *Candida albicans* by the Peroxidase/SCN-H₂O₂ 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.
- 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, A. Y., D. Destoumieux, et al. (2002). "Human beta-defensin-2 production in keratinocytes is regulated by interleukin-1, bacteria, and the state of differentiation." *J Invest Dermatol* 118(2): 275-81.
- 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.
- Lloyd, A. (1996). "HIV infection and AIDS." *P N G Med J* 39(3): 174-80.
- Lockhart, S. R., C. Pujol, et al. (2002). "In *Candida albicans*, white-opaque switchers are homozygous for mating type." *Genetics* 162(2): 737-45.
- Lundqvist, C., V. Baranov, et al. (1994). "Cytokine profile and ultrastructure of intraepithelial gamma delta T cells in chronically inflamed human gingiva suggest a cytotoxic effector function." *J Immunol* 153(5): 2302-12.
- 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.
- Magee, B. B. and P. T. Magee (2000). "Induction of mating in *Candida albicans* by construction of MTL α and MTL α strains." *Science* 289(5477): 310-3.
- Mangasarian, A. and D. Trono (1997). "The multifaceted role of HIV Nef." *Res Virol* 148(1): 30-3.
- Mangino, G., Z. A. Percario, et al. (2007). "In vitro treatment of human monocytes/macrophages with myristoylated recombinant Nef of human immunodeficiency virus type 1 leads to the activation of mitogen-activated protein kinases, IkappaB kinases, and interferon regulatory factor 3 and to the release of beta interferon." *J Virol* 81(6): 2777-91.

- Mantovani, A., A. Sica, et al. (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." *Trends Immunol* 25(12): 677-86.
- Marcotte, H. and M. C. Lavoie (1998). "Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A." *Microbiol Mol Biol Rev* 62(1): 71-109.
- 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.
- Martinez, F. O., A. Sica, et al. (2008). "Macrophage activation and polarization." *Front Biosci* 13: 453-61.
- Mastroianni, C. M., G. d'Ettorre, et al. (2000). "Interleukin-15 enhances neutrophil functional activity in patients with human immunodeficiency virus infection." *Blood* 96(5): 1979-84.
- Matsuura, K., F. Otsuka, et al. (1998). "Effects of interferons on tumour necrosis factor alpha production from human keratinocytes." *Cytokine* 10(7): 500-5.
- Mazurier, J. and G. Spik (1980). "Comparative study of the iron-binding properties of human transferrins. I. Complete and sequential iron saturation and desaturation of the lactotransferrin." *Biochim Biophys Acta* 629(2): 399-408.
- Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr. (2000). "Innate immunity." *N Engl J Med* 343(5): 338-44.
- Medzhitov, R. and C. A. Janeway, Jr. (1998). "Innate immune recognition and control of adaptive immune responses." *Semin Immunol* 10(5): 351-3.
- Mencacci, A., C. Montagnoli, et al. (2002). "CD80+Gr-1+ myeloid cells inhibit development of antifungal Th1 immunity in mice with candidiasis." *J Immunol* 169(6): 3180-90.
- Mencacci, A., K. Perruccio, et al. (2001). "Defective antifungal T-helper 1 (TH1) immunity in a murine model of allogeneic T-cell-depleted bone marrow transplantation and its restoration by treatment with TH2 cytokine antagonists." *Blood* 97(5): 1483-90.
- Montagnoli, C., A. Bacci, et al. (2002). "B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*." *J Immunol* 169(11): 6298-308.
- Moretta, A., C. Bottino, et al. (2002). "What is a natural killer cell?" *Nat Immunol* 3(1): 6-8.
- Muller, U., W. Stenzel, et al. (2007). "IL-13 induces disease-promoting type 2 cytokines, alternatively activated macrophages and allergic inflammation during pulmonary infection of mice with *Cryptococcus neoformans*." *J Immunol* 179(8): 5367-77.
- Munoz, J. F., S. Salmen, et al. (1999). "Effect of human immunodeficiency virus type 1 on intracellular activation and superoxide production by neutrophils." *J Infect Dis* 180(1): 206-10.
- 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.
- 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.
- Naglik, J. R., S. J. Challacombe, et al. (2003). "*Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis." *Microbiol Mol Biol Rev* 67(3): 400-28, table of contents.
- Nather, K. and C. A. Munro (2008). "Generating cell surface diversity in *Candida albicans* and other fungal pathogens." *FEMS Microbiol Lett* 285(2): 137-45.
- Ndhlovu, L. C., J. M. Chapman, et al. (2008). "Suppression of HIV-1 plasma viral load below detection preserves IL-17 producing T cells in HIV-1 infection." *AIDS* 22(8): 990-2.

- Netea, M. G., C. A. Van Der Graaf, et al. (2002). "The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis." *J Infect Dis* 185(10): 1483-9.
- Netea, M. G., J. W. van Der Meer, et al. (1999). "Fas-FasL interactions modulate host defense against systemic *Candida albicans* infection." *J Infect Dis* 180(5): 1648-55.
- Netea, M. G., A. G. Vonk, et al. (2003). "Differential role of IL-18 and IL-12 in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection." *Eur J Immunol* 33(12): 3409-17.
- Nikawa, H., L. P. Samaranayake, et al. (1993). "The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*." *Arch Oral Biol* 38(12): 1057-63.
- 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.
- Odden, K., K. Schenck, et al. (1995). "High numbers of T cells in gingiva from patients with human immunodeficiency virus (HIV) infection." *J Oral Pathol Med* 24(9): 413-9.
- Odds, F. C., A. J. Brown, et al. (2004). "*Candida albicans* genome sequence: a platform for genomics in the absence of genetics." *Genome Biol* 5(7): 230.
- Olivetta, E., C. Mallozzi, et al. (2009). "HIV-1 Nef induces p47(phox) phosphorylation leading to a rapid superoxide anion release from the U937 human monoblastic cell line." *J Cell Biochem*.
- 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.
- Pepin, L. F., T. Roger, et al. (1993). "Preferential V delta 1 expression among TcR gamma/delta-bearing T cells in human oral epithelium." *Scand J Immunol* 37(3): 289-94.
- 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.
- Pfaller, M. A., R. N. Jones, et al. (1998). "National surveillance of nosocomial blood stream infection due to species of *Candida* other than *Candida albicans*: frequency of occurrence and antifungal susceptibility in the SCOPE Program. SCOPE Participant Group. Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiologic." *Diagn Microbiol Infect Dis* 30(2): 121-9.
- Pietrella, D., G. Bistoni, et al. (2006). "*Candida albicans* mannoprotein influences the biological function of dendritic cells." *Cell Microbiol* 8(4): 602-12.
- Pimpinelli, N., L. Borgognoni, et al. (1991). "CD36(OKM5)+ dendritic cells in the oral mucosa of HIV- and HIV+ subjects." *J Invest Dermatol* 97(3): 537-42.
- Pirofski, L. A. and A. Casadevall (2009). "Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis." *J Exp Med* 206(2): 269-73.
- 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.
- Pivarcsi, A., L. Kemeny, et al. (2004). "Innate immune functions of the keratinocytes. A review." *Acta Microbiol Immunol Hung* 51(3): 303-10.

- Poli, G., G. Pantaleo, et al. (1993). "Immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection." *Clin Infect Dis* 17 Suppl 1: S224-9.
- Pope, M. and A. T. Haase (2003). "Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection." *Nat Med* 9(7): 847-52.
- Porcheray, F., B. Samah, et al. (2006). "Macrophage activation and human immunodeficiency virus infection: HIV replication directs macrophages towards a pro-inflammatory phenotype while previous activation modulates macrophage susceptibility to infection and viral production." *Virology* 349(1): 112-20.
- 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.
- Poveda, E., V. Briz, et al. (2006). "HIV tropism: diagnostic tools and implications for disease progression and treatment with entry inhibitors." *AIDS* 20(10): 1359-67.
- Reef, S. E. and K. H. Mayer (1995). "Opportunistic candidal infections in patients infected with human immunodeficiency virus: prevention issues and priorities." *Clin Infect Dis* 21 Suppl 1: S99-102.
- Reichart, P. A., P. Khongkhunthian, et al. (2003). "Oral manifestations in HIV-infected individuals from Thailand and Cambodia." *Med Microbiol Immunol* 192(3): 157-60.
- 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.
- Riggle, P. J., K. A. Andrutis, et al. (1999). "Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture." *Infect Immun* 67(7): 3649-52.
- Romagnoli, P., N. Pimpinelli, et al. (1997). "Immunocompetent cells in oral candidiasis of HIV-infected patients: an immunohistochemical and electron microscopical study." *Oral Dis* 3(2): 99-105.
- Romani, L. (2000). "Innate and adaptive immunity in *Candida albicans* infections and saprophytism." *J Leukoc Biol* 68(2): 175-9.
- Romani, L. (2008). "Cell mediated immunity to fungi: a reassessment." *Med Mycol*: 1-15.
- Ryder, M. I., J. R. Winkler, et al. (1988). "Elevated phagocytosis, oxidative burst, and F-actin formation in PMNs from individuals with intraoral manifestations of HIV infection." *J Acquir Immune Defic Syndr* 1(4): 346-53.
- Samaranayake, L. P. (1992). "Oral mycoses in HIV infection." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 73(2): 171-80.
- Samaranayake, Y. H. and L. P. Samaranayake (2001). "Experimental oral candidiasis in animal models." *Clin Microbiol Rev* 14(2): 398-429.
- 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.
- Schonwetter, B. S., E. D. Stolzenberg, et al. (1995). "Epithelial antibiotics induced at sites of inflammation." *Science* 267(5204): 1645-8.
- Serafini, S., A. Fraternali, et al. (2009). "Effect of macrophage depletion on viral DNA rebound following antiretroviral therapy in a murine model of AIDS (MAIDS)." *Antiviral Res* 81(2): 93-102.

- Simon, J. H. and M. H. Malim (1996). "The human immunodeficiency virus type 1 Vif protein modulates the postpenetration stability of viral nucleoprotein complexes." *J Virol* 70(8): 5297-305.
- Sitheequ, M. A. and L. P. Samaranayake (2003). "Chronic hyperplastic candidosis/candidiasis (candidal leukoplakia)." *Crit Rev Oral Biol Med* 14(4): 253-67.
- Soll, D. R. (2004). "Mating-type locus homozygosity, phenotypic switching and mating: a unique sequence of dependencies in *Candida albicans*." *Bioessays* 26(1): 10-20.
- Sonneborn, A., D. P. Bockmuhl, et al. (1999). "Chlamydospore formation in *Candida albicans* requires the Efg1p morphogenetic regulator." *Infect Immun* 67(10): 5514-7.
- Squier, C. A. and M. J. Kremer (2001). "Biology of oral mucosa and esophagus." *J Natl Cancer Inst Monogr*(29): 7-15.
- Steele, C., J. Leigh, et al. (2000). "Growth inhibition of *Candida* by human oral epithelial cells." *J Infect Dis* 182(5): 1479-85.
- Steidley, K. E., S. H. Thompson, et al. (1992). "A comparison of T4:T8 lymphocyte ratio in the periodontal lesion of healthy and HIV-positive patients." *J Periodontol* 63(9): 753-6.
- Sundstrom, P. (2002). "Adhesion in *Candida* spp." *Cell Microbiol* 4(8): 461-9.
- 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. (2003). "Oral lactoferrin treatment of experimental oral candidiasis in mice." *Antimicrob Agents Chemother* 47(8): 2619-23.
- Tavanti, A., D. Campa, et al. (2006). "*Candida albicans* isolates with different genomic backgrounds display a differential response to macrophage infection." *Microbes Infect* 8(3): 791-800.
- Tavitian, A., J. P. Raufman, et al. (1986). "Oral candidiasis as a marker for esophageal candidiasis in the acquired immunodeficiency syndrome." *Ann Intern Med* 104(1): 54-5.
- Teunissen, M. B., C. W. Koomen, et al. (1998). "Interleukin-17 and interferon-gamma synergize in the enhancement of proinflammatory cytokine production by human keratinocytes." *J Invest Dermatol* 111(4): 645-9.
- Thepen, T., N. Van Rooijen, et al. (1989). "Alveolar macrophage elimination in vivo is associated with an increase in pulmonary immune response in mice." *J Exp Med* 170(2): 499-509.
- Torres, S. R., A. Garzino-Demo, et al. (2008). "Salivary histatin-5 and oral fungal colonisation in HIV+ individuals." *Mycoses*.
- Vacharaksa, A., A. C. Asrani, et al. (2008). "Oral keratinocytes support non-replicative infection and transfer of harbored HIV-1 to permissive cells." *Retrovirology* 5: 66.
- van Burik, J. A. and P. T. Magee (2001). "Aspects of fungal pathogenesis in humans." *Annu Rev Microbiol* 55: 743-72.
- van Enkevort, F. H., M. G. Netea, et al. (1999). "Increased susceptibility to systemic candidiasis in interleukin-6 deficient mice." *Med Mycol* 37(6): 419-26.

- 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., N. Kors, et al. (1989). "Macrophage subset repopulation in the spleen: differential kinetics after liposome-mediated elimination." *J Leukoc Biol* 45(2): 97-104.
- Van Rooijen, N., N. Kors, et al. (1990). "Depletion and repopulation of macrophages in spleen and liver of rat after intravenous treatment with liposome-encapsulated dichloromethylene diphosphonate." *Cell Tissue Res* 260(2): 215-22.
- 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.
- van Rooijen, N. and E. van Kesteren-Hendrikx (2002). "Clodronate liposomes: perspectives in research and therapeutics." *J Liposome Res* 12(1-2): 81-94.
- Vargas, K., S. A. Messer, et al. (2000). "Elevated phenotypic switching and drug resistance of *Candida albicans* from human immunodeficiency virus-positive individuals prior to first thrush episode." *J Clin Microbiol* 38(10): 3595-607.
- Vazquez-Torres, A. and E. Balish (1997). "Macrophages in resistance to candidiasis." *Microbiol Mol Biol Rev* 61(2): 170-92.
- Vazquez, J. A. and J. D. Sobel (2002). "Mucosal candidiasis." *Infect Dis Clin North Am* 16(4): 793-820, v.
- 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., J. N. Sun, et al. (2007). "The role of released ATP in killing *Candida albicans* and other extracellular microbial pathogens by cationic peptides." *Purinergic Signal* 3(1-2): 91-7.
- 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.
- Watts, D. H. (2002). "Management of human immunodeficiency virus infection in pregnancy." *N Engl J Med* 346(24): 1879-91.
- Weaver, C. T., L. E. Harrington, et al. (2006). "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties." *Immunity* 24(6): 677-88.
- Wei, X. Q., I. G. Charles, et al. (1995). "Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase." *Nature* 375(6530): 408-11.
- Weindl, G., J. R. Naglik, et al. (2007). "Human epithelial cells establish direct antifungal defense through TLR4-mediated signaling." *J Clin Invest* 117(12): 3664-72.
- Weng, M., D. Huntley, et al. (2007). "Alternatively activated macrophages in intestinal helminth infection: effects on concurrent bacterial colitis." *J Immunol* 179(7): 4721-31.
- Wenisch, C., B. Parschalk, et al. (1996). "Dysregulation of the polymorphonuclear leukocyte--*Candida* spp. interaction in HIV-positive patients." *AIDS* 10(9): 983-7.

- Whiteway, M. and C. Bachewich (2007). "Morphogenesis in *Candida albicans*." *Annu Rev Microbiol* 61: 529-53.
- Whiteway, M. and U. Oberholzer (2004). "Candida morphogenesis and host-pathogen interactions." *Curr Opin Microbiol* 7(4): 350-7.
- Wiedow, O., J. Harder, et al. (1998). "Antileukoprotease in human skin: an antibiotic peptide constitutively produced by keratinocytes." *Biochem Biophys Res Commun* 248(3): 904-9.
- Wormley, F. L., Jr., J. Cutright, et al. (2003). "Multiple experimental designs to evaluate the role of T-cell-mediated immunity against experimental vaginal *Candida albicans* infection." *Med Mycol* 41(5): 401-9.
- Wormley, F. L., Jr., C. Steele, et al. (2001). "Resistance of T-cell receptor delta-chain-deficient mice to experimental *Candida albicans* vaginitis." *Infect Immun* 69(11): 7162-4.
- 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. Samaranayake, et al. (1999). "Inhibition of growth and secreted aspartyl proteinase production in *Candida albicans* by lysozyme." *J Med Microbiol* 48(8): 721-30.
- 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.
- Zelante, T., A. De Luca, et al. (2007). "IL-23 and the Th17 pathway promote inflammation and impair antifungal immune resistance." *Eur J Immunol* 37(10): 2695-706.
- Zhu, J. and W. E. Paul (2008). "CD4 T cells: fates, functions, and faults." *Blood* 112(5): 1557-69.