

Université de Montréal

**Étude de l'infection au *Cryptococcus* chez la souris transgénique exprimant le  
génomme du VIH-1**

par  
Kassandre Leongson

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

2011

© Kassandre Leongson, 2011

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Étude de l'infection au *Cryptococcus* chez la souris transgénique exprimant le  
génomme du VIH-1**

Présenté par :

Kassandre Leongson

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

**Dr. Carolina Alfieri**

Président-rapporteur

**Dr. Louis de Repentigny**

Directeur de recherche

**Dr. Petronela Ancuta**

Membre du jury

## RÉSUMÉ

*Cryptococcus neoformans* var. *grubii* est responsable de la majeure partie des infections au *Cryptococcus* chez les individus infectés au VIH-1. *Cryptococcus gattii* infecte généralement les personnes immunocompétentes. Afin de comprendre les mécanismes responsables de la susceptibilité différentielle de ces espèces lors de l'infection au VIH-1, nous avons établi et caractérisé un modèle novateur de la cryptococcose chez des souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV<sup>MutA</sup> exprimant des gènes du VIH-1, et qui développent une maladie similaire au SIDA. Les objectifs sont de démontrer une différence significative au niveau de la survie, de la réponse inflammatoire et du recrutement cellulaire pulmonaire en fonction de la présence du transgène et de l'espèce de *Cryptococcus* inoculée. Des analyses de survie, d'histopathologie et de cytométrie en flux sur les populations cellulaires pulmonaires ont été effectuées. Les souris Tg infectées avec *C. neoformans* H99 ou C23 ont démontré une survie réduite et une augmentation de la dissémination comparativement aux souris non-Tg, contrairement aux souris Tg infectées au *C. gattii* R265 ou R272. L'examen histopathologique des poumons de souris Tg infectées au H99 a montré une faible réponse inflammatoire, contrairement aux souris non-Tg. Pour la souche R265, il y avait une très faible réponse inflammatoire chez les deux types de souris. Enfin, l'étude des populations cellulaires du poumon a révélé chez les souris Tg une augmentation des pourcentages de macrophages interstitiels et de cellules polymorphonucléaires, ainsi qu'une diminution des lymphocytes T CD4+ et CD8+, indépendamment de l'infection au *Cryptococcus*. Ce modèle novateur représente donc un outil très pertinent pour l'étude de l'immunopathogenèse de la cryptococcose dans le contexte du VIH.

## MOTS CLÉS :

Cryptococcose

VIH-1

Modèle animal

## **SUMMARY**

*Cryptococcus neoformans* var. *grubii* is the most frequent cause of AIDS-associated cryptococcosis worldwide, in sharp contrast to *Cryptococcus gattii* which usually infects immunocompetent individuals. To understand the mechanisms which cause differential susceptibility to these cryptococcal species in HIV infection, we established and characterized a novel model of cryptococcosis in CD4C/HIV<sup>MutA</sup> transgenic (Tg) mice expressing HIV-1 gene products and developing an AIDS-like disease. The objectives are to demonstrate significant differences in survival, inflammatory response and lung cell recruitment in Tg mice compared to non-Tg mice when inoculated with different species of *Cryptococcus*. Tg mice infected with *C. neoformans* strains H99 or C23 consistently displayed reduced survival and an increase of systemic dissemination compared to non-Tg mice, in contrast with Tg mice infected with *C. gattii* strains R265 or R272. Histopathologic examination of lungs of Tg mice infected with H99 showed a minimal inflammatory cell response, in contrast with the non-Tg mice infected with H99. In the case of R265, both types of mice failed to induce a strong inflammatory response. Finally, expression of the HIV-1 transgene increased the percentage of pulmonary interstitial macrophages and polymorphonuclear cells, while reducing CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T-lymphocytes, independently of cryptococcal infection. This model therefore provides a powerful new tool to further investigate the immunopathogenesis of cryptococcosis in the specific context of HIV-infection.

## **KEY WORDS**

Cryptococcosis

HIV-1

Animal model

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>iv</b>
<b>Liste des figures.....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des sigles et abréviations.....</b>	<b>vi</b>
<b>Remerciements.....</b>	<b>x</b>
<b>Avant-propos.....</b>	<b>1</b>
<b>Chapitre 1 : <i>Cryptococcus</i> et la cryptococcose.....</b>	<b>2</b>
1.1 Description de <i>Cryptococcus neoformans</i> et <i>Cryptococcus gattii</i> .....	2
1.2 Reproduction.....	3
1.3 Épidémiologie.....	6
1.4 Manifestations cliniques.....	12
1.5 Pathogenèse.....	15
1.5.1 Mécanismes d'évitement de la phagocytose.....	17
1.5.2 Dissémination.....	19
1.5.3 Facteurs de virulence.....	21
1.5.3.1 Croissance à 37°C.....	21
1.5.3.2 Synthèse de mélanine.....	22
1.5.3.3 La capsule.....	23
1.5.4 Autres facteurs de virulence importants.....	27
1.5.5 Autres facteurs impliqués dans la virulence.....	29
1.6 Immunité contre <i>Cryptococcus</i> .....	33
1.6.1 Macrophages alvéolaires.....	34
1.6.2 Éosinophiles.....	36
1.6.3 Cellules dendritiques.....	37
1.6.4 Cellules NK.....	39

1.6.5 Neutrophiles.....	40
1.6.6 Lymphocytes T CD4+.....	41
1.6.7 Réponse Th1, Th2 et Th17.....	43
1.6.8 Lymphocytes T CD8+.....	45
1.6.9 Lymphocytes $\gamma\delta$ .....	46
1.6.10 Lymphocytes B.....	46
1.6.11 Système du complément.....	48
1.6.12 Cellules microgliales.....	48
<b>Chapitre 2 : La cryptococcose dans le contexte du VIH .....</b>	<b>50</b>
2.1 Le virus d'immunodéficience humaine 1 (VIH-1).....	50
2.1.1 Réplication du VIH-1.....	52
2.1.2 Les stades de l'infection au VIH-1.....	53
2.2 Perturbations du système immunitaire par VIH-1.....	54
2.3 La cryptococcose chez l'individu atteint du VIH-1.....	56
2.4 Traitements.....	58
2.4.1 Traitements de première intention.....	58
2.4.2 Résistance aux antifongiques.....	59
2.4.3 Traitements de seconde intention.....	60
2.4.4 Anticorps monoclonaux.....	61
<b>Chapitre 3 : Modèles utilisés pour étudier la cryptococcose.....</b>	<b>63</b>
3.1 Modèles existants.....	63
3.2 La souris CD4C/HIV <sup>Mut</sup> .....	67
<b>Hypothèse.....</b>	<b>69</b>
<b>Chapitre 4 : Matériel et méthodes.....</b>	<b>70</b>
4.1 Modèle animal.....	70
4.2 Infection des souris au <i>C. neoformans</i> et au <i>C. gattii</i> .....	71

4.3 Études de survie.....	72
4.4 Prélèvement et préparation des organes pour décompte des unités formatrices de colonies (CFUs).....	72
4.5 Préparation des organes pour l’histopathologie.....	73
4.6 Mesure de l’épaisseur des capsules.....	74
4.7 Cytométrie en flux des populations de cellules immunitaires pulmonaires.. .....	74
4.8 Analyse statistique.....	76
<b>Chapitre 5 : Résultats.....</b>	<b>77</b>
<b>Chapire 6 : Discussion.....</b>	<b>94</b>
<b>Bibliographie.....</b>	<b>109</b>
<b>Annexe 1.....</b>	<b>xi</b>
<b>Annexe 2.....</b>	<b>xii</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I - Anticorps utilisés pour l'analyse des cellules immunitaires en cytométrie en flux.....	75
Tableau II - Combinaisons d'anticorps utilisés pour l'analyse des populations cellulaires en cytométrie en flux.....	76
Tableau III – Unités formatrices de colonies (CFUs) dans les organes de souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV <sup>MutA</sup> inoculées par voie intra-nasale avec <i>Cryptococcus neoformans</i> souche H99.....	79
Tableau IV – Unités formatrices de colonies (CFUSs) dans les organes de souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV <sup>MutA</sup> inoculées par voie intra-nasale avec <i>Cryptococcus neoformans</i> souche C23.....	80
Tableau V – Unités formatrices de colonies (CFUs) dans les organes de souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV <sup>MutA</sup> inoculées par voie intra-nasale avec <i>Cryptococcus gattii</i> souche R265.....	81
Tableau VI – Unités formatrices de colonies (CFUs) dans les organes de souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV <sup>MutA</sup> inoculées par voie intra-nasale avec <i>Cryptococcus gattii</i> souche R272.....	82
Tableau VII – Unités formatrices de colonies (CFUs) dans les organes de souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV <sup>MutA</sup> inoculées par voie intra-nasale avec $1.25 \times 10^4$ CFU de <i>Cryptococcus neoformans</i> souche H99.....	85
Tableau VIII – Unités formatrices de colonies (CFUs) dans les organes de souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV <sup>MutA</sup> inoculées par voie intra-nasale avec $1.25 \times 10^5$ CFU de <i>Cryptococcus gattii</i> souche R265.....	85
Tableau IX - Diamètre des corps cellulaires et épaisseur de la capsule de <i>C. neoformans</i> H99 et <i>C. gattii</i> R265 sur des coupes de tissu pulmonaire colorées à la mucicarmin 7 ou 14 jours après l'infection de souris Tg CD4C/HIV <sup>MutA</sup> ou non-Tg.....	89



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 – Reproduction sexuée et fructification monocaryotique chez <i>Cryptococcus neoformans</i>.....</b>	<b>4</b>
<b>Figure 2 – Répartition géographique de <i>C. gattii</i>.....</b>	<b>7</b>
<b>Figure 3 – Distribution des cas humains et vétérinaires de cryptococcose en Colombie-Britannique de 1999 à 2006.....</b>	<b>9</b>
<b>Figure 4 – Organisation du génome du VIH-1.....</b>	<b>51</b>
<b>Figure 5 – Construction des souris transgéniques CD4C/HIV<sup>Mut</sup>.....</b>	<b>68</b>
<b>Figure 6 - Courbes de mortalité chez les souris transgéniques CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-transgéniques infectées au <i>C. neoformans</i> H99 ou C23, et <i>C. gattii</i> R265 ou R272, à trois inocula différents .....</b>	<b>78</b>
<b>Figure 7 - Histopathologie des poumons de souris transgéniques et non-transgéniques infectées par <i>C. neoformans</i> H99 ou <i>C. gattii</i> R265, à 7 et 14 jours après l'infection et en pré-mortem.....</b>	<b>87</b>
<b>Figure 8 - Pourcentage de cellules immunitaires pulmonaires quantifiées par cytométrie en flux, 7 jours après l'infection de souris transgéniques et non-transgéniques non-infectées, ou infectées au <i>C. neoformans</i> H99 ou au <i>C. gattii</i> R265.....</b>	<b>91</b>
<b>Figure 9 - Nombre total de cellules pulmonaires extraites après 7 jours chez des souris transgéniques et non-transgéniques non-infectées, ou infectées au <i>C. neoformans</i> H99 ou au <i>C. gattii</i> R265.....</b>	<b>93</b>

## LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

ACS1: *acetyl coA synthethase 1*

AFR1: *antifungal resistance 1*

App1: *antiphagocytic protein 1*

ARN: acide ribonucléique

Atg8: *autophagy-related protein 8*

Atx1: *antioxidant 1*

cAMP: *cyclic adenosine monophosphate*

CAP: *cyclase-associated protein*

Ccc2: *cross-complement Ca (2+)*

CCL2: *chemokine (C-C motif) ligand 2*

CCR2: *chemokine (C-C motif) receptor 2*

CD: *cluster of differentiation*

CDs: cellules dendritiques

Cdc24: *cell division cycle 24, also known as guanine-nucleotide exchange factor*

CFU: *colony forming units*

Chs3: chitine synthase 3

Cir1: *changed intracellular redox state 1*

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

CO<sub>2</sub>: dioxyde de carbone

CPS1: *carboxypeptidase yscS 1*

CR: *complement receptor*

CSF-1: *colony stimulating factor 1*

CTLA-4: *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*

Ctr1: *copper transport 1*

CUF1: *copper responsive factor 1*

CX3CL1: *chemokine (C-X3-C motif) ligand 1*

CXCL1: *chemokine (C-X-C motif) ligand 1*

CXCL8: *chemokine (C-X-C motif) ligand 8*

DTH: *Delayed-type hypersensitivity*

DYRK3: *dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 3*

EFG1: *exit from G1*

ERG11: *ergosterol 11*

FcR: *fc (fragment crystallizable) receptor*

FSK1: *forskolin 1*

GalXM: *galactoxylomannane*

Gcn5: *general control nonderepressible 5*

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

GPA1: *G protein alpha subunit 1*

Gpr: *G protein-coupled receptor 1*

GRASP: *Golgi reassembly and stocking protein*

GXM: *glucuronoxylomannane*

HAART: *highly active antiretroviral therapy*

HDA RDP3: *histone deacetylase reduced potassium dependency 3*

HOCL: *acide hypochlorique*

iBALT: *inducible bronchus-associated lymphoid tissue*

ICAM-1: *inter-cellular adhesion molecule 1*

IFN: *interféron*

Ig: *immunoglobuline*

IL: *interleukine*

IPC1: *inositol phosphoryl ceramide synthase 1*

ISC1: *inositol phosphosphingolipid phospholipase C*

JAK/STAT: *janus kinase / signal transducer and activator of transcription*

LAC1: laccase 1

LCR: liquide céphalo-rachidien

L-DOPA: L-3,4-dihydroxyphénylalanine

LPL1: *lysophospholipase 1*

MAPK: *mitogen-activated protein kinase*

MAT: *mating type*

Mbf1: *multiprotein bridging factor 1*

MBL: *mannose binding lectin*

MCP-1: *monocyte chemotactic protein-1*

MET3: *methionine 3*

MF $\alpha$ : *mating factor alpha*

MIP: *macrophage inflammatory protein*

MPD1: mannitol-1-phosphate déshydrogénase

NK: *Natural Killer*

NMT1: N-myristoyltransférase 1

NO: monoxyde d'azote

OH: radicaux hydroxyls

PBMC: *peripheral blood mononuclear cell*

PFK: phosphofructokinase

PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase

PKA: *protein kinase A*

PKC: *protein kinase C*

PLB: phospholipase B

PMN: polymorphonucléaire neutrophile

Rac1: *ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*

RANTES: *regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*

Ras: *rat sarcoma*

ROM2: *RhO1 multicopy 2*

ROS: *reactive oxygen species*

SEC14: *secretory 14*

SIDA: syndrome d'immunodéficience acquise

SIR2: *silent information regulator 2*

SMS: sphingomyéline synthase

SNC: système nerveux central

Snf5: *sucrose non-fermenting 5*

SOD: super oxyde dismutase

SP: *surfactant protein*

SREBP: *sterol response element binding protein cholesterol biosynthesis pathway*

STE12 $\alpha$ : *sterile 12 alpha*, facteur de transcription

TGF: *transforming growth factor*

Th: *T helper*

TLR: *Toll-like receptor*

TNF: *tumor necrosis factor*

TOP1: topoisomérase 1

URE1: uréase 1

UV: rayons ultra-violets

VIH: virus de l'immunodéficience humaine

## REMERCIEMENTS

Merci au Dr. Louis de Repentigny pour son accueil au sein de son équipe, pour son aide précieuse, pour sa sagesse, pour sa disponibilité, pour son soutien et son intérêt soutenu tout au long de mon trajet de Maîtrise.

Merci à Mme Francine Aumont pour son aide et ses enseignements au laboratoire, pour son amitié, pour ses conversations enrichissantes, pour sa générosité et surtout sa patience.

Merci à Mathieu Goupil pour son aide tout au long de mon séjour au laboratoire, pour m'avoir fait rire durant les étapes d'apprentissage les plus difficiles, pour sa compréhension et pour son support constant.

Merci à M. Serge Sénéchal, pour son aide, ses conseils et ses blagues durant mon apprentissage.

Merci au Dr. Louis Gaboury pour l'interprétation des lames d'histopathologie, ainsi que l'équipe de la plateforme d'histologie de l'IRIC pour la coloration de ces lames.

Merci à Miguel Chagnon, statisticien de l'Université de Montréal pour les nombreuses analyses statistiques.

Merci à ma famille et mes amis pour tout le support, la patience et l'amour qu'ils m'ont donné durant ces deux années.

Merci du fond du cœur.

## AVANT-PROPOS

L'immunodéficience créée par le VIH chez l'homme le rend vulnérable à plusieurs infections opportunistes. *Cryptococcus* cause une infection mortelle chez environ 10% des patients sidéens mondialement (Harrison 2000). En Afrique sub-saharienne, l'incidence de la cryptococcose s'élève à 30% chez les patients séropositifs (Harrison 2000). Les thérapies antifongiques disponibles tel le fluconazole sont efficaces chez les patients infectés au *Cryptococcus*, mais leur disponibilité demeure limitée en Afrique (Harrison 2000).

En 1999, une éclosion d'infections au *C. gattii* chez des individus immunocompétents a débuté sur l'Île de Vancouver en Colombie-Britannique (Kronstad, Attarian et al. 2011). Depuis le début de cette éclosion, environ 236 cas humains, dont 19 décès ont été rapportés (Kronstad, Attarian et al. 2011). Les cas d'infections au *C. gattii* se sont depuis étendus vers les États-Unis, principalement les états de Washington et de l'Oregon (Byrnes and Heitman 2009)

## CHAPITRE 1: *CRYPTOCOCCUS* ET LA *CRYPTOCOCCOSE*

### Description de *Cryptococcus neoformans* et *Cryptococcus gattii*

En 1894, Otto Busse isole un pathogène sur une lésion du tibia d'un patient ayant des ressemblances avec le genre *Saccharomyces* (Barnett 2010). Durant la même année, Francesco Sanfelice isole une levure similaire à celle de Busse d'un jus de pêches qu'il nomme *Saccharomyces neoformans*. En 1901, Jean-Paul Vuillemin renomme cette dernière *Cryptococcus neoformans* puisque celle-ci ne produit pas d'ascospores. Ce sont les premières descriptions du genre *Cryptococcus*, un basidiomycète de l'ordre des *Tremellales* (Barnett 2010). On dénombre 37 espèces dont seules *neoformans*, *gattii*, *laurentii* et *albidus* sont capables de causer une infection chez l'homme (Li and Mody 2010). Ce n'est que depuis quelques années que *Cryptococcus gattii* est considéré comme une espèce à part entière de *Cryptococcus neoformans*. Des différences physiques, biochimiques, phénotypiques, leur habitat naturel, l'épidémiologie, les manifestations cliniques et réponses aux thérapies antifongiques ont permis sa séparation en une espèce distincte (Kwon-Chung, Polacheck et al. 1982; Sorrell 2001; Kwon-Chung and Varma 2006). *C. neoformans* comprend trois sérotypes basés sur les réactions d'agglutination de composants capsulaires: A, D et AD. Ces sérotypes sont séparés en deux variétés soit *C. neoformans var. neoformans* (D) et *C. neoformans var. grubii* (A) (Li and Mody 2010). *C. gattii* comprend les sérotypes B et C. Enfin, quatre types moléculaires chez *C. neoformans* (VNI-VNIV) et *C. gattii* (VGI-VGIV) ont été identifiés (Li and Mody 2010). Le génome de *Cryptococcus* contient à 65% des séquences homologues conservées, alors que 10% lui est unique et 25% ne correspond pas à des séquences de basidiomycètes (Loftus, Fung et al. 2005). Trois gènes essentiels ont été identifiés : *NMT1* qui régit la résistance à la température, *TOP1* qui encode la topoisomérase 1 et *FKSI* qui encode la  $\beta$ -1,3 glucane synthase (Hull and Heitman 2002).



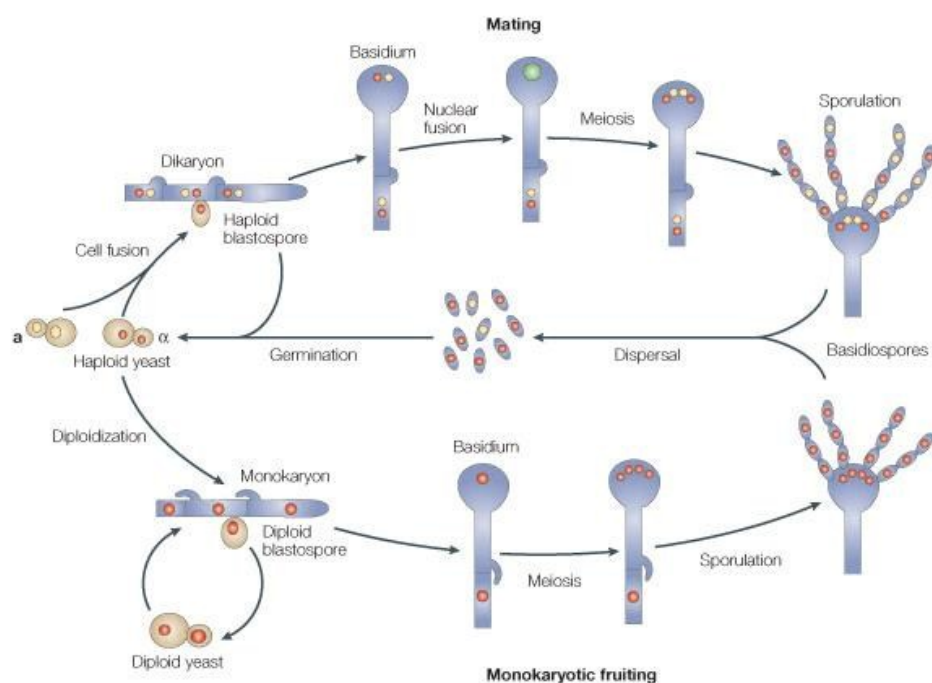
*Cryptococcus sp.* est un saprophyte. On le retrouve dans plusieurs environnements tels le sol, les légumes en état de putréfaction, le bois, les produits laitiers et les plantes (Sorrell and Ellis 1997). Pour ce qui est de *C. neoformans*, une énorme quantité de cette espèce est isolée d'excréments de pigeons, et ce mondialement (Nielsen, De Obaldia et al. 2007). L'habitat naturel de *C. neoformans* serait plutôt la végétation et les excréments de pigeons offriraient plutôt un habitat avantageux pour sa croissance (Sorrell and Ellis 1997). *C. gattii* a été pour la première fois isolé et caractérisé en 1970 (Gatti and Eeckels 1970; Vanbreuseghem and Takashio 1970). Par la suite, *C. gattii* a été isolé en Australie en 1989 par Ellis et Pfeiffer (Ellis and Pfeiffer 1990). *C. gattii* est essentiellement une espèce tropicale et subtropicale (Hagen and Boekhout 2010). Les enquêtes environnementales indiquent que son habitat naturel pourrait être les forêts de l'hémisphère sud et particulièrement celles contenant des eucalyptus et surtout *Eucalyptus camaldulensis* (Ellis and Pfeiffer 1990). L'éclosion en Colombie-Britannique, où plusieurs cas d'infection par *C. gattii* ont été répertoriés depuis 1999, pousse par contre à étendre la niche de *C. gattii* aux zones tempérées, car ce dernier a été isolé sur de nombreuses espèces d'arbres natifs de l'Île de Vancouver (environ 10% regroupant plus de 10 espèces) et pas sur des espèces importées tels les eucalyptus (Kidd, Bach et al. 2007; Hagen and Boekhout 2010).

### Reproduction

*Cryptococcus sp.* se présente généralement sous forme de levures, autant dans l'environnement que chez un sujet infecté, qui se reproduisent par bourgeonnement (Idnurm, Bahn et al. 2005; Lin 2009). Il peut aussi exceptionnellement prendre la forme de pseudo-hyphes, forme intermédiaire de la levure et l'hyphe, qui serait un mécanisme de survie dans les amibes, prédateur environnemental (Lin 2009).

La reproduction sexuée chez *Cryptococcus* n'a jamais été observée dans la nature ou chez un patient infecté (Idnurm, Bahn et al. 2005). Grâce à ses expériences en laboratoire en 1975 et 1976, c'est à Kwon-Chung que nous devons la découverte des

formes parfaites de *Cryptococcus neoformans* et *Cryptococcus gattii*, soit *Filobasidiella neoformans* et *Filobasidiella bacillispora* (Kwon-Chung 1976). La reproduction sexuée chez *C. neoformans* var. *neoformans* est robuste et ne semble pas dépendre du croisement entre deux souches identiques (Fraser, Subaran et al. 2003; Nielsen, Cox et al. 2003). La variété *grubii* (sérotypage A), quant à elle, dépend du croisement entre deux souches identiques (Fraser, Subaran et al. 2003; Nielsen, Cox et al. 2003). Cependant, le sérotypage A a évolué pour devenir essentiellement asexué et est maintenant prédominant lors d'infections chez les patients atteints d'infection au VIH-1 (Sorrell 2001). On retrouve généralement peu ou pas de reproduction sexuée chez *C. gattii* (Fraser, Subaran et al. 2003). Or, les souches isolées de l'écllosion en Colombie-Britannique sont très fertiles et unisexuées (Fraser, Subaran et al. 2003).



Copyright © 2005 Nature Publishing Group  
 Nature Reviews | Microbiology

**Figure 1. Reproduction sexuée et fructification monokaryotique chez *Cryptococcus neoformans*.** (Haut) En conditions limitantes, les levures de type a et α sécrètent des phéromones et il y a fusion. Il y a filamentation après la formation du dikaryon. Au stade de la baside, les noyaux fusionnent et il y a méiose, suivie par la production d'une chaîne de basidiospores. (Bas) Lors de la fructification monokaryotique, les cellules d'un même type (a ou α) deviennent diploïdes par endoduplication ou

fusion nucléaire, suivie d'une fusion de deux cellules. Il y a formation d'une hyphe (connections rudimentaires), développement d'une baside, méiose, et formation de basidiospores haploïdes. (Idnurm, Bahn et al. 2005)

Lors de la reproduction sexuée, déclenchée lorsque les conditions de croissance sont pauvres, une cellule du type  $\alpha$  fusionne avec une cellule  $\alpha$  (Figure 1). Il y a formation d'un dicaryon et d'une hyphe (Figure 1). Suite à la fusion des noyaux, il y a formation d'une baside sur laquelle des basidiospores sont produites par bourgeonnement (Lin and Heitman 2006). *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* peut aussi se reproduire par fructification monocaryotique. Ce mode de reproduction, induit lors de faibles conditions de survie, est contrôlé par le facteur de transcription STE12 $\alpha$  et la phéromone MF $\alpha$ , et implique la fusion de deux cellules du même type ( $\alpha$ ) (Hull and Heitman 2002; McClelland, Chang et al. 2004). Il y a formation d'une hyphe et lorsque la baside se forme, il y a méiose et production de basidiospores (Chang, Wickes et al. 2000; Lin, Hull et al. 2005; Lin and Heitman 2006).

Le cycle sexuel de *Cryptococcus* est contrôlé par le locus MAT (Idnurm, Bahn et al. 2005). Ce dernier est relativement gros (>100kb), contient environ 25 gènes qui codent pour les phéromones ainsi que leur récepteur, des facteurs de transcription et des éléments associés aux cascades MAPK (Idnurm, Bahn et al. 2005). Le locus MAT de *Cryptococcus* diffère de celui des autres basidiomycètes. Premièrement, il contient des éléments provenant des systèmes bipolaire et tétrapolaire du locus MAT, alors que les levures hétérothalliques ne contiennent qu'un seul des deux systèmes (McClelland, Chang et al. 2004). Deuxièmement, le locus MAT de *Cryptococcus* est beaucoup plus gros et contient des gènes qui codent pour des fonctions non-relées à la reproduction (Lengeler, Fox et al. 2002). Troisièmement, le transfert des gènes est unidirectionnel. Chez les autres levures hétérothalliques, MAT $\alpha$  peut transférer ses gènes à MAT $\alpha$  et vice-versa. Par contre, chez *Cryptococcus*, MAT $\alpha$  est le seul qui peut transférer ses gènes. MAT $\alpha$  est donc uniquement producteur des phéromones et receveur des gènes. Il est aussi établi que MAT $\alpha$  est le locus prédominant dans la nature (Litvintseva, Marra et al. 2003; Nielsen, Cox et al. 2005; Bui, Lin et al. 2008). Quatrièmement, les basidiospores de *Cryptococcus* ne sont pas contenues dans des

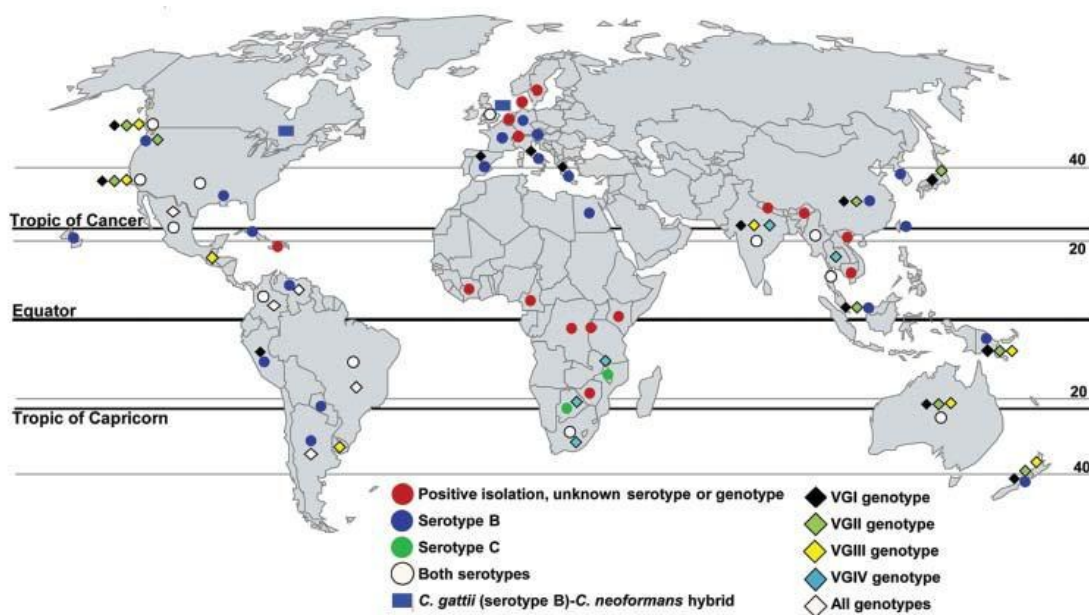
basides comme chez les autres basidiomycètes (Hull and Heitman 2002). Ainsi, les spores sont libres et facilement détachées et transportées par les éléments comme l'air. Enfin, STE12, facteur de transcription de *S. cerevisiae*, bien conservé chez les autres levures et organismes fongiques, diffère chez *Cryptococcus*. Il ne se retrouve que sur les cellules MAT $\alpha$  et ne joue pas de rôle dans la reproduction, sauf pour la fructification monocaryotique chez laquelle il régule l'expression de la phéromone MF $\alpha$ 1 (Chang, Wickes et al. 2000; Hull and Heitman 2002).

### Épidémiologie

*\*Afin d'alléger le texte, Cryptococcus comprend C. neoformans et C. gattii*

La description des infections au *Cryptococcus*\* n'est pas récente. Des cas de cryptococcose ont été rapportés avant les années 50 en Europe et en Afrique (Molez 1998). Avant la pandémie du SIDA, les cas de cryptococcose en Amérique du Nord se chiffraient à environ 0.2 - 0.8 par 100 000 habitants par année (Pfaller and Diekema 2010). Depuis le début de la pandémie du SIDA, l'incidence de la cryptococcose a considérablement augmenté et on estime qu'il y a présentement environ 1 million de cas par année à l'échelle mondiale dont 625 000 sont mortels (Kronstad, Attarian et al. 2011). En Amérique du Nord et en Europe, les cas sont moins nombreux, mais la mortalité atteint tout de même 40% (Litvintseva, Carbone et al. 2011). *C. neoformans*, pathogène opportuniste chez les sidéens, est responsable de l'augmentation de l'incidence de la cryptococcose chez les patients atteints de l'infection au VIH. Mondialement, *C. neoformans var. grubii* (sérotypé A) cause la majorité (95%) des infections chez les sidéens (Sorrell 2001; Idnurm, Bahn et al. 2005; Lin 2009). En Europe, le sérotypé A est responsable d'environ 51% des cas d'infection chez les patients atteints du VIH-1 (Bovers, Hagen et al. 2008). Le sérotypé D est aussi retrouvé mondialement chez les patients atteints du VIH-1, mais beaucoup plus rarement que le sérotypé A. De plus, il est moins virulent que ce dernier (Litvintseva, Kestenbaum et al. 2005; Pukkila-Worley and Mylonakis 2008). Le sérotypé hybride AD est rarement isolé, surtout en Amérique du Nord et en

Europe (Litvintseva, Kestenbaum et al. 2005). Il faut noter qu'un nouveau type de *C. neoformans* var. *grubii* (sérotypage A, nouveau type moléculaire VNB) a été isolé récemment en Afrique. Il semble pour l'instant être uniquement présent au sud de l'Afrique, soit au Botswana et au Malawi (Litvintseva, Kestenbaum et al. 2005; Bui, Lin et al. 2008).

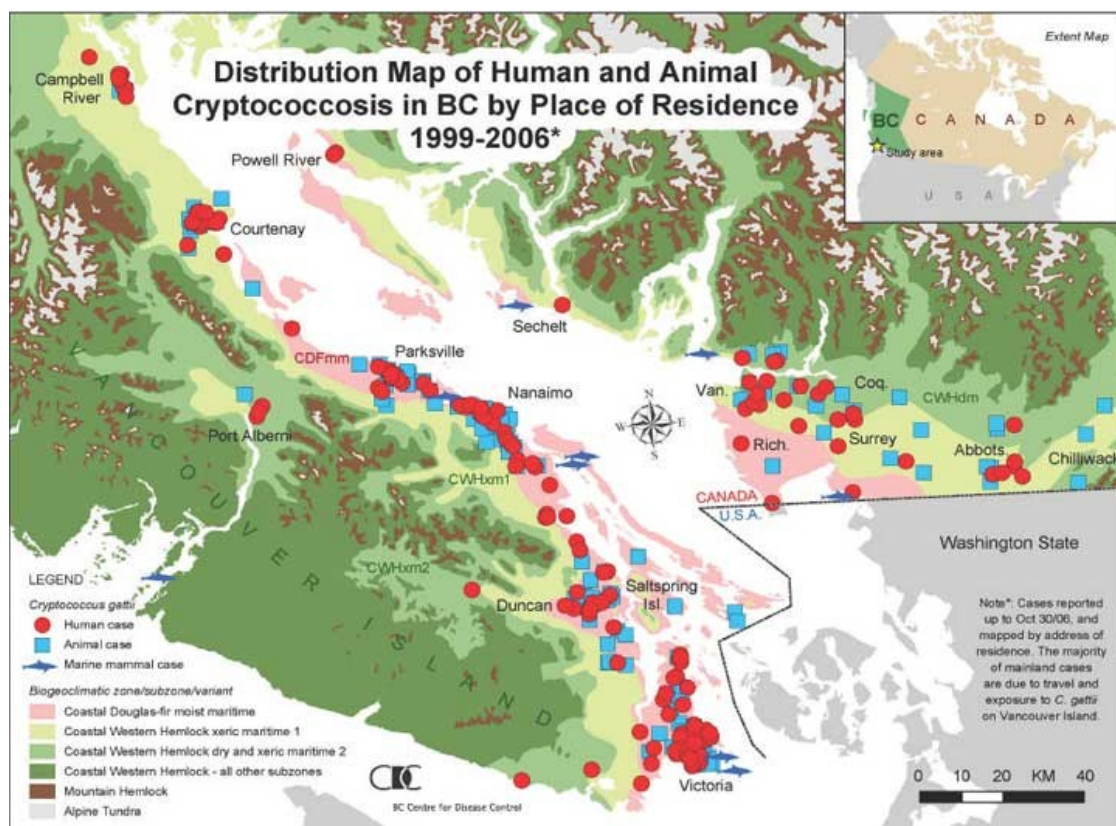


**Figure 2. Répartition géographique de *C. gattii*.** Isolations mondiales de *C. gattii* d'origines humaine, animale et environnementale. Les cercles indiquent les sérotypes, les diamants les génotypes, et les rectangles des hybrides *C. gattii* - *C. neoformans*. Le sérotypage B est le plus souvent isolé mondialement chez des patients. (Springer and Chaturvedi 2010)

Les sérotypes B et C, associés à *Cryptococcus gattii*, sont généralement retrouvés dans les régions géographiques tropicales et subtropicales (Figure 2) (Litvintseva, Kestenbaum et al. 2005). La majorité des cas d'infection rapportés proviennent de l'Australie, où *C. gattii* a été isolé pour la première fois sur des eucalyptus, de l'Afrique, de l'Inde, de l'Italie, de la Papouasie-Nouvelle-Guinée, de l'Amérique du Sud et au sud de la Californie (Mak, Klinkenberg et al. 2010). Il est intéressant de noter qu'il y a 1.5 fois plus de cas d'infections vétérinaires par *C. gattii* que de cas humains (Mak, Klinkenberg et al. 2010). Parmi les animaux infectés on retrouve les

animaux domestiques tels le chat, le chien, le bétail, le porc, le lapin, le cheval, le mouton, ainsi que les animaux sauvages comme le koala, l'oiseau, le furet, la souris et le renard (Lin and Heitman 2006). Le sérotype B est le plus souvent isolé chez les patients mondialement (Springer and Chaturvedi 2010). Le sérotype C est moins souvent isolé, chez des patients atteints ou non du VIH-1, en Inde, en Afrique et au sud de la Californie (Springer and Chaturvedi 2010). L'incidence d'infection au *C. gattii* n'a pas augmenté depuis la pandémie d'infection au VIH-1 (Morgan, McCarthy et al. 2006). Il est important de noter que, contrairement au *C. neoformans*, *C. gattii* infecte surtout les personnes séronégatives (Lin and Heitman 2006). En effet, en Australie et en Papouasie-Nouvelle Guinée, 70-80% des patients infectés par *C. gattii* ne sont pas infectés au VIH-1 (Lin and Heitman 2006). Néanmoins, *C. gattii* infecte rarement les personnes séropositives, soit un peu plus de 10% des patients en Afrique et du sud de la Californie (Lin and Heitman 2006; Pfaller and Diekema 2010). Une des raisons qui pourrait expliquer le nombre moins élevé d'infections par *C. gattii* chez les personnes séropositives est leur exposition limitée à des sources environnementales de *C. gattii* (Pfaller and Diekema 2010).

En janvier 2002, le CDC de la Colombie-Britannique rapporte une augmentation inquiétante des infections causées par *C. gattii* sur la côte est de l'île de Vancouver, se chiffrant à ~8.5-37 cas par million d'habitants, ce qui est bien au dessus de la moyenne australienne (0.94/million) où les cas d'infection par *C. gattii* sont les plus courants (Hoang, Maguire et al. 2004; Pukkila-Worley and Mylonakis 2008; Pfaller and Diekema 2010). En effet, depuis 1999, 236 cas humains dont 19 décès, ainsi que plusieurs cas vétérinaires ont été rapportés (Kronstad, Attarian et al. 2011). La majorité des patients n'avait pas d'immunodéficience.



**Figure 3. Distribution des cas humains et vétérinaires de cryptococcose en Colombie-Britannique de 1999 à 2006.** Les foyers principaux d'infection, autant humaines (rouge) qu'animales (bleu), sont Duncan, Parksville et Nanaimo, situés dans le petit écosystème Coastal Douglas-fir de l'Île de Vancouver. (BC Center for Disease Control)

Les villes de Duncan, Parksville et Nanaimo sont les foyers principaux des cas rapportés de cryptococcose, autant chez les humains que chez les animaux (Figure 3) (Duncan, Schwantje et al. 2006; Chambers, MacDougall et al. 2008). Le type moléculaire majeur responsable des cas d'infection est le VGIIa, unique à la région nord-ouest de l'Amérique du Nord. Un autre type mineur, VGIIb, est aussi responsable de quelques cas d'infection sur l'Île de Vancouver (Kidd, Hagen et al. 2004). La souche R265, du type VGIIa, responsable de la plupart des cas d'infection, possède un seul locus sexuel : MAT $\alpha$  (Campbell and Carter 2006; Ngamskulrunroj, Serena et al. 2011). VGIIa est très fertile et a un très haut taux de recombinaison (Campbell and Carter 2006). Il est important de noter que les cas d'infection se sont étendus vers les États-Unis, principalement les états de Washington et de l'Oregon (Byrnes and Heitman 2009). Le type moléculaire principal isolé aux États-Unis est

aussi le VGIIa, mais il faut noter qu'un nouveau type, VGIIc, est apparu en Oregon (Byrnes and Heitman 2009; Byrnes, Li et al. 2010). Puisque *C. gattii* est normalement retrouvé dans les régions tropicales et subtropicales, il est inquiétant de constater que ce dernier est isolé de l'environnement et cause des infections dans les régions tempérées comme l'Île de Vancouver. De plus, Vancouver est très prisée par les touristes (~7.5 million de visiteurs/année), augmentant considérablement les chances d'exposition et d'infection (Lindberg, Hagen et al. 2007; Chambers, MacDougall et al. 2008).

Plusieurs facteurs pourraient expliquer l'émergence croissante des cas de cryptococcose mondialement : les changements écologiques et démographiques, l'augmentation des échanges commerciaux entre plusieurs pays, ainsi que des changements au niveau de l'adaptation de *Cryptococcus* (Nielsen, De Obaldia et al. 2007).

La distribution mondiale cosmopolite de *C. neoformans* est probablement due aux pigeons (Haag-Wackernagel and Moch 2004; Nielsen, De Obaldia et al. 2007; Lin 2009). L'isolation de *C. neoformans* chez les pigeons, au niveau par exemple du bec et du cloaque, ainsi que dans leurs excréments séchés démontre que les pigeons sont des vecteurs parfaits pour la dispersion du champignon (Rosario, Hermoso de Mendoza et al. 2005). En effet, la migration des oiseaux et la domestication des pigeons ont eu pour conséquence une présence constante des pigeons dans les milieux humains et donc une augmentation du risque d'infection (Nielsen, De Obaldia et al. 2007). La pandémie du SIDA a aussi contribué à une augmentation fulgurante des cas de cryptococcose par *C. neoformans* (Chakrabarti 2007; Kronstad, Attarian et al. 2011).

La première isolation de *C. gattii* répertoriée chez un patient à l'extérieur de l'Australie était à Fort Point, San Francisco, Californie en 1991 (Chakrabarti, Jatana et al. 1997). En effet, avant cette isolation, la majorité des cas d'infection par *C. gattii* était chez les aborigènes au nord de l'Australie (Ellis 1987; Ellis and Pfeiffer 1990; Jenney, Pandithage et al. 2004). Ces derniers vivent dans les milieux ruraux, près des forêts d'eucalyptus. La propagation de *C. gattii* en Australie s'est probablement



effectuée par les oiseaux et les koalas qui nichent sur les eucalyptus ainsi que par la période de floraison et les courants d'eau (Ellis and Pfeiffer 1990; Sorrell and Ellis 1997; Sorrell 2001). En Inde, *C. gattii* a été isolé dans l'air, la végétation et le sol et semble avoir été importé par des graines d'eucalyptus (Chakrabarti, Jatana et al. 1997). Contrairement à *C. neoformans*, le mouvement géographique de *C. gattii* est plus restreint et certains chercheurs émettent l'hypothèse que dans la majorité des cas, *C. gattii* se propagerait par les exportations d'arbres et de graines ainsi que lors de la transplantation de ces arbres dans de nouveaux pays (Nielsen, De Obaldia et al. 2007).

Le mécanisme de la dispersion de *C. gattii* sur l'Île de Vancouver est différent. La majorité des souches responsables des infections appartiennent au génotype VGIIa associé au Nord-Ouest de l'Amérique du Nord (Pukkila-Worley and Mylonakis 2008; Kronstad, Attarian et al. 2011). Puisque le sérotype majeur mondial est VGI, il est peu probable que les souches de l'Île de Vancouver proviennent d'Australie, où toutes les souches de *C. gattii* isolées sont VGI (Kidd, Bach et al. 2007). De plus, des échantillons de sol provenant de l'Île de Vancouver contiennent le *C. gattii* en plus grande proportion que les échantillons prélevés des arbres (Kidd, Bach et al. 2007). Contrairement à l'Australie, les chercheurs n'ont pas démontré une plus forte concentration de *C. gattii* dans l'air lors de la floraison (Kidd, Bach et al. 2007). Il faut aussi rappeler que les souches de *C. gattii* isolées sur l'Île de Vancouver sont toutes MAT $\alpha$  et qu'elles sont extrêmement fertiles. Ceci pourrait indiquer que ces souches se reproduisent par fructification monocaryotique et se disperseraient par leurs spores (Campbell and Carter 2006; Kidd, Bach et al. 2007; Saul, Krockenberger et al. 2008; Byrnes and Heitman 2009). Certains chercheurs pensent que le type VGIIa de *C. gattii* pourrait originer de la recombinaison d'une souche de sérotype B d'Amérique du Sud et d'une souche australienne importée et que les conditions environnementales, par exemple le réchauffement climatique, auraient permis la création et la propagation de ce nouveau génotype sur l'Île de Vancouver (Fraser, Giles et al. 2005; Byrnes, Bildfell et al. 2009; Datta, Bartlett et al. 2009). Les déplacements et activités humaines, par exemple la marche (semelle des souliers) et les voitures, le transport passif par les animaux ainsi que les nombreuses migrations des oiseaux dans les régions endémiques pourraient aussi expliquer en partie la

propagation de *C. gattii* sur l'Île de Vancouver (Duncan, Schwantje et al. 2006; Kidd, Bach et al. 2007; Byrnes, Bildfell et al. 2009). Il est important de mentionner que pour l'instant, les cas d'infection au *C. gattii* et l'isolation du champignon de l'environnement semblent se limiter aux zones centrales et le sud-est côtier de l'Île de Vancouver, les Gulf Islands, le Sunshine Coast et le Vancouver Lower Mainland (Kidd, Chow et al. 2007). Les États-Unis font aussi face à une éclosion d'infection par *C. gattii*. Au départ, les chercheurs croyaient que les souches provenaient toutes de Vancouver, puisque 95% des infections étaient causées par des souches VGII (Byrnes and Heitman 2009). Or, ils font face eux aussi à de nouveaux génotypes endémiques, soit VGIIc en Oregon et VGIII en Californie (Byrnes and Heitman 2009; Byrnes and Marr 2011).

### Manifestations cliniques

La majorité des humains est exposée à *Cryptococcus* et ce, dès l'enfance (Bovers, Hagen et al. 2008). Ce dernier peut coloniser un individu pendant des mois ou des années et en général ne progresse jamais à l'état d'infection (Kronstad, Attarian et al. 2011). Chez certains individus, particulièrement ceux qui ont une immunodéficience, par exemple les sidéens, ceux qui ont subi une greffe d'organe, qui reçoivent des médicaments immunosuppresseurs, les diabétiques, et ceux atteints d'une maladie auto-immune, sont incapables d'empêcher la prolifération de *Cryptococcus* et il y a alors établissement d'une infection opportuniste (Buchanan and Murphy 1998; Husain, Wagener et al. 2001; Shirley and Baddley 2009; Li and Mody 2010; Pfaller and Diekema 2010). Fait intéressant, il est très rare d'observer une infection par *Cryptococcus* chez les patients cancéreux ou chez ceux qui ont reçu une greffe de moelle osseuse (Pukkila-Worley and Mylonakis 2008). Puisque la transmission d'animal à humain ou interhumaine de *Cryptococcus* n'a pas vraiment été documentée, la réactivation d'une infection latente est l'hypothèse la plus acceptée pour expliquer le déclenchement de l'infection chez l'homme (Lin and Heitman 2006). D'ailleurs, un modèle murin de la cryptococcose a permis de démontrer un

état de porteur de faibles concentrations de levures chez des individus sains en l'absence de maladie (Lindell, Ballinger et al. 2006).

L'âge semble être un facteur déterminant dans l'apparition de la cryptococcose (Galanis and Macdougall 2010). Les enfants en santé sont très peu affectés et l'incidence chez les enfants sidéens est seulement d'environ 1% (Subramanian and Mathai 2005; Severo, Xavier et al. 2009; Pfaller and Diekema 2010). Chez les patients non-sidéens atteints de la cryptococcose, la moyenne d'âge est  $\geq 45$  ans (Pfaller and Diekema 2010). Le sexe est aussi un facteur, puisque les hommes semblent être en moyenne 3 fois plus affectés que les femmes par la cryptococcose (Chen, Sorrell et al. 2000; Lortholary, Improvisi et al. 2002; Subramanian and Mathai 2005; Leal, Faganello et al. 2008; Li and Mody 2010). Par exemple, une étude étendue sur 9 ans menée en France démontre que le nombre d'hommes sidéens infectés atteints de cryptococcose était quatre fois plus élevé que le nombre de femmes sidéennes infectées, et qu'il était deux fois plus élevé chez les séronégatifs (Dromer, Mathoulin et al. 1996). Une étude rétrospective menée par Subramanian et son équipe démontre que 90% des 105 patients traités à leur centre étaient des hommes (Subramanian and Mathai 2005). Une étude menée au Brésil sur 125 patients (95% sidéens) entre 2000 et 2005 au Laboratório Central de Saúde Pública démontre que 77% des patients étaient des hommes (Leal, Faganello et al. 2008).

Les signes et symptômes de la cryptococcose sont très nombreux et ne se manifestent pas tous nécessairement chez un même patient: toux, céphalée, fièvre, nausées, vomissements, douleur à la poitrine, perte de poids (souvent un indice de dissémination), troubles visuels et d'ouïe, état mental altéré, et coma (Pappalardo and Melhem 2003; Black and Baden 2007; Baddley, Perfect et al. 2008; Leal, Faganello et al. 2008; Costa, Souza et al. 2009; Shirley and Baddley 2009; Li and Mody 2010; Kronstad, Attarian et al. 2011). Des radiographies pulmonaires sont toujours effectuées dans le cas de signes et symptômes respiratoires. L'infection par *Cryptococcus* est souvent caractérisée par la présence de nodules pulmonaires (60% - 80% des cas) (Shirley and Baddley 2009). Il faut par la suite confirmer la présence de *Cryptococcus sp.* en faisant une détection d'antigène capsulaire et des cultures du

liquide de lavage broncho-alvéolaire, du sang et du liquide céphalo-rachidien (LCR), ce dernier prélevé par ponction lombaire (Goldman, Lee et al. 1995; Jackson and Hosseinipour 2010; Li and Mody 2010). *C. gattii* se différencie de *C. neoformans* par sa croissance sur gélose CDB (Créatinine-Dextrose-Bromthymol), sur laquelle *C. gattii* produit une teinte bleutée dans le milieu (Kwon-Chung, Polacheck et al. 1982).

*Cryptococcus* infecte principalement les poumons, la porte d'entrée, ainsi que le système nerveux central (SNC) dans le cas de dissémination systémique (Li and Mody 2010; Kronstad, Attarian et al. 2011). Généralement, chez les patients immunocompétents, l'infection se limite aux poumons (Shankar, Mahadevan et al. 2007). L'infection se dissémine à l'extérieur des poumons chez plus de 50% des patients immunodéficients (Shankar, Mahadevan et al. 2007). Les sidéens sont les plus affectés par la dissémination de *Cryptococcus* et en particulier vers le cerveau, causant ainsi une méningo-encéphalite produisant, en l'absence de traitement, un taux de mortalité de 100% (Li and Mody 2010; Pfaller and Diekema 2010). À noter qu'il est aussi possible d'être atteint d'une infection par *Cryptococcus* ailleurs que dans les poumons et au SNC. Des infections de la peau, de la moelle osseuse, des yeux, du myocarde, des os et articulations, de la prostate, de la vessie et du foie ont aussi été rapportées (Lacaz Cda, Heins-Vaccari et al. 2002; Lin and Heitman 2006; Shen, Cheng et al. 2006; Gultasli, Ercan et al. 2007; Singh, Rahman et al. 2007; Liu, Yang et al. 2009; Li and Mody 2010). Chez les animaux, l'infection se limite généralement aux voies respiratoires (Lin and Heitman 2006).

Chez les patients infectés par *C. neoformans*, la dissémination au SNC est rare sauf s'ils sont infectés au VIH-1 (Chakrabarti 2007). La dissémination vers d'autres organes est plus courante que chez *C. gattii* (Jean, Fang et al. 2002; Galanis, Hoang et al. 2009). Sur les radiographies pulmonaires, *C. neoformans* se présente généralement sous forme de nombreuses petites lésions (Severo, Gazzoni et al. 2009).

Chez les patients infectés par *C. gattii*, il y a moins de dissémination systémique, mais les cryptococcomes, ainsi que les séquelles cérébrales, sont plus courantes que pour *C. neoformans* (Sorrell 2001; Morgan, McCarthy et al. 2006; Chakrabarti 2007; Bovers, Hagen et al. 2008; Pukkila-Worley and Mylonakis 2008; Galanis, Hoang et

al. 2009). Sur les radiographies, *C. gattii* est identifiable par la présence de grosses masses ou nodules inflammatoires (Severo, Gazzoni et al. 2009).

Sur l'Île de Vancouver, les chercheurs ont déterminé que la période d'incubation de *C. gattii* est plus courte que pour *C. neoformans* (Kidd, Chow et al. 2007). Elle est d'environ de 2 à 11 mois, avec une moyenne de 6 à 7 mois avant l'apparition des premiers symptômes, comparativement à une moyenne de 110 mois pour *C. neoformans* (Garcia-Hermoso, Janbon et al. 1999; MacDougall and Fyfe 2006; Kidd, Chow et al. 2007). Les manifestations cliniques pulmonaires les plus courantes sont la pneumonie, la toux, les douleurs à la poitrine et la perte de poids, tandis que les manifestations cérébrales les plus courantes sont les céphalées, la fièvre, les sueurs nocturnes et l'hypertension inter-crânienne (Galanis, Hoang et al. 2009; 2010; MacDougall, Fyfe et al. 2011). La moyenne d'âge des patients était de 59 ans (2010; Galanis and Macdougall 2010). Environ 40% étaient immunodéprimés, dont un grand nombre était ou est toujours fumeur (MacDougall, Fyfe et al. 2011). Seulement six patients sur 239 atteints de cryptococcose étaient infectés au VIH-1 (1999-2008) (MacDougall, Fyfe et al. 2011). Sur les radiographies, il y a présence chez 75% des patients de nodules, d'infiltrations, de lésions et/ou de consolidation au niveau des poumons (Galanis, Hoang et al. 2009). Les chercheurs n'ont pas établi de lien entre le sexe des patients et l'infection par *C. gattii* sur l'Île de Vancouver (MacDougall, Fyfe et al. 2011).

### Pathogenèse

L'agent responsable de l'infection initiale serait la spore ou la levure déshydratée (Botts and Hull 2010). Les deux sont très petites, environ 1-5 $\mu$ m, et peuvent facilement se loger dans les alvéoles pulmonaires. Par contre, puisque la levure déshydratée n'est pas très résistante, la spore serait un meilleur candidat pour survivre à l'entrée initiale dans le poumon (Botts, Giles et al. 2009; Giles, Dagenais et al. 2009; Velagapudi, Hsueh et al. 2009; Botts and Hull 2010). Les spores de *Cryptococcus* sont caractérisées par une couche très épaisse, morphologiquement

différente de la surface de la levure mature et qui la protège contre le stress de l'environnement (Botts, Giles et al. 2009). Il est intéressant de noter que les spores de *C. neoformans* et *C. gattii* ne sont pas identiques. En effet, la spore de *C. neoformans* a une forme plutôt arrondie et une surface rugueuse parsemée de pics tandis que celle de *C. gattii* est beaucoup plus allongée et a une surface lisse (Velagapudi, Hsueh et al. 2009). Puisque les spores sont rapidement éliminées par les macrophages alvéolaires, elles doivent activer leur germination le plus rapidement possible (Giles, Dagenais et al. 2009). Elles semblent d'ailleurs auto-suffisantes en ce qui concerne les éléments nécessaires pour leur germination (Velagapudi, Hsueh et al. 2009).

Après avoir été phagocyté par les macrophages alvéolaires via l'interaction de  $\beta(1,3)$ -glucane de la spore et Dectine-1 et CD11b de l'hôte, *Cryptococcus* doit survivre dans ces derniers (Giles, Dagenais et al. 2009). Dans l'environnement, les amibes sont capables de phagocyter *Cryptococcus*, et selon les chercheurs, les tactiques d'évasion que *Cryptococcus* a dû, au cours de l'évolution, développer pour survivre dans les amibes sont aussi utilisées dans les macrophages (Greub and Raoult 2004). La levure *Cryptococcus* est capable de survivre et de bourgeonner dans l'environnement acide induit par les compartiments de lysosomes des macrophages (Levitz, Nong et al. 1999). Il faut aussi noter la formation de vésicules remplies de polysaccharides et une perméabilité de la membrane des phagosomes dans le cytoplasme des macrophages ayant phagocyté les levures (Feldmesser, Tucker et al. 2001; Tucker and Casadevall 2002; Rodrigues, Nimrichter et al. 2007). Ces vésicules, sécrétées par *Cryptococcus* renferment des polysaccharides nécessaires à la formation de la capsule. La levure produit aussi des vésicules qui contiennent des éléments nécessaires à sa virulence et à sa survie, soit les enzymes laccase, phospholipase B et uréase qui seront traitées plus loin, et les exporte dans le cytoplasme des macrophages (Rodrigues, Nakayasu et al. 2008; Kronstad, Attarian et al. 2011). Dans les macrophages murins, ces vésicules induisent la production de TNF- $\alpha$ , d'IL-10, de TGF- $\beta$  ainsi qu'une production de monoxyde d'azote (NO), indiquant qu'elles ont la capacité d'induire une réponse immunitaire contre *Cryptococcus* (Oliveira, Freire-de-Lima et al. 2010).

### Mécanismes d'évitement de la phagocytose

*Cryptococcus*, pathogène intracellulaire facultatif, est aussi capable d'éviter la phagocytose. Il est résistant aux lectines se liant au mannose de la levure et aux protéines tensioactives A, des collectines capables d'opsoniser des pathogènes en vue de les phagocyter (Seider, Heyken et al. 2010). De plus, *Cryptococcus* exprime la protéine anti-phagocytaire App1 qui se lie aux récepteurs CR2 et CR3 des macrophages alvéolaires, empêchant encore une fois sa reconnaissance et sa phagocytose (Stano, Williams et al. 2009).

*C. neoformans* peut aussi éviter la phagocytose par l'épaississement de sa capsule et la formation de cellules géantes. Il est établi que les phospholipides de protozoaires, par exemple les amibes, et de mammifères reconnus par *Cryptococcus* provoquent l'épaississement de sa capsule ainsi que la formation de cellules géantes (Chrisman, Albuquerque et al. 2011). Deux récepteurs couplés aux protéines G, Ste3a (signal de phéromones) et Gpr5 contrôlent la formation des cellules géantes à partir de la cascade cAMP / PKA (Zaragoza, Garcia-Rodas et al. 2010; Okagaki, Wang et al. 2011). Elles peuvent être cinq à dix fois plus larges que les levures normales (50-100  $\mu\text{m}$  vs 5-10  $\mu\text{m}$ ) et elles constituent de 10 à 80% de la population de levures dans les poumons dépendamment du temps d'infection (Feldmesser, Kress et al. 2001; Okagaki, Strain et al. 2010; Zaragoza, Garcia-Rodas et al. 2010; Okagaki, Wang et al. 2011). Elles deviennent géantes en redémarrant leur division cellulaire (cycle G1) sans jamais se diviser et sont capable de produire des cellules filles, sont polyploïdes, ont une structure capsulaire plus solide et, chez les souris, semblent être surtout présentes dans les poumons où il n'y a pas beaucoup d'inflammation, par exemple lors d'infections chroniques (Zaragoza, Garcia-Rodas et al. 2010; Okagaki, Wang et al. 2011). Elles résistent bien sûr à la phagocytose, au stress oxydatif et nitrosatif (Okagaki, Strain et al. 2010). Par contre, chez les cellules géantes, il y a réduction de la capacité à pénétrer le SNC (Okagaki, Strain et al. 2010). Puisque ces cellules sont capables de survivre à la réponse immunitaire initiale de l'hôte, elles pourraient donc permettre l'établissement de l'infection (Okagaki, Strain et al. 2010).

Pour ce qui est de la phagocytose par les neutrophiles (PMNs), chez l'homme, le GXM de la capsule de *Cryptococcus* réduit l'expression de L-sélectine (CD62L) sur les PMNs, qui est nécessaire à la migration à travers les tissus, réduit le roulement des neutrophiles sur les cellules endothéliales et induit la perte du récepteur TNFR, ce qui empêche les neutrophiles d'être stimulés par le TNF- $\alpha$  (Urban, Lourido et al. 2006).

*Cryptococcus* est aussi capable de changer son phénotype *in vitro* et *in vivo* (Goldman, Fries et al. 1998; Jain and Fries 2008). Les trois phénotypes, chez lesquels la structure de la paroi et la composition biochimique de la capsule sont différentes, sont caractérisés par leur apparence sur gélose : le phénotype lisse, colonies lisses aux rebords lisses; le phénotype mucoïde, colonies lisses à surface mucoïde; et le phénotype ridé qui présente une surface irrégulière aux rebords dentelés (Fries, Goldman et al. 1999; Guerrero, Jain et al. 2006). Bien que ce dernier phénotype soit rarement isolé des prélèvements cliniques, les deux premiers sont couramment identifiés, mais la fréquence d'isolation exacte n'est pas connue (Guerrero, Jain et al. 2006). Les mécanismes moléculaires exacts du changement de phénotype ne sont pas déterminés et ces changements ne sont probablement pas spontanés (Jain, Guerrero et al. 2006; Jain, Cook et al. 2009). Cependant, trois gènes ont été identifiés comme essentiels à ce changement : SIR2, qui joue un rôle dans la réponse au stress, EFG1, qui encode les facteurs de transcription pour la filamentation, et HDA RPD3, des histones déacétylases (D'Souza and Heitman 2001). La forme mucoïde est beaucoup plus virulente, autant chez l'homme que chez les modèles animaux, et elle induit une plus grande résistance à la phagocytose ainsi qu'un degré plus élevé d'inflammation, soit une augmentation du recrutement des macrophages, des cellules NK et des lymphocytes T cytotoxiques (Pietrella, Fries et al. 2003; Guerrero and Fries 2008; Guerrero, Jain et al. 2010). De plus, en réponse à la forme mucoïde, les macrophages sont activés de façon alternative et il y a un changement vers une réponse Th17, ce qui dans les deux cas provoque une persistance de l'infection (Guerrero, Jain et al. 2010). Dans un modèle d'infection chez le rat, la pression intra-crânienne était très élevée après l'infection avec des souches mucoïdes et il y avait une concentration élevée de polysaccharides capsulaires dans le LCR, ce qui correspond aux



manifestations cliniques chez les sidéens (Sukroongreung, Lim et al. 2001; Fries, Lee et al. 2005). *In vitro*, les deux sérotypes (A et D) de *C. neoformans* et le sérotype B de *C. gattii* ont la capacité de changer de phénotype (Jain, Li et al. 2006; Jain and Fries 2008). Les formes parentales, à partir desquelles il y a changement de phénotype chez les deux espèces, diffèrent. Chez *C. neoformans*, la forme parentale est lisse, tandis que chez *C. gattii*, la forme parentale est mucoïde (Jain and Fries 2008). *In vivo*, les deux espèces de *Cryptococcus* ont aussi la capacité de changer leur phénotype, mais contrairement à *C. neoformans*, *C. gattii* peut changer son phénotype, par exemple de la forme lisse vers la forme mucoïde, et revenir à la forme lisse, ce qui l'aiderait à traverser la barrière hémato-encéphalique, puisque la forme mucoïde traverse difficilement cette dernière (Jain, Guerrero et al. 2006; Jain and Fries 2008). *C. gattii* a donc la capacité de changer plusieurs fois son phénotype *in vivo*, tandis que *C. neoformans* ne peut changer de phénotype qu'une seule fois.

### Dissémination

La dissémination systémique de *Cryptococcus* à partir de la porte d'entrée pulmonaire s'effectue en employant plusieurs mécanismes. Il faut d'abord savoir que chez l'homme les pneumocytes de type II qui tapissent les alvéoles ont un récepteur pour GXM, le composant capsulaire majeur de *Cryptococcus* (Merkel and Scofield 1997; Barbosa, Fonseca et al. 2006; Filler and Sheppard 2006). Les levures peuvent donc être internalisées et ainsi pénétrer la barrière physique des poumons.

Un autre mécanisme employé par *Cryptococcus* pour disséminer hors des poumons est de demeurer dans les phagocytes et de les utiliser comme véhicule de transport à la manière d'un Cheval de Troie. *In vivo*, les phagocytes qui ont internalisé les levures permettent à *Cryptococcus* d'entrer dans le cerveau lorsque ces derniers traversent la barrière hémato-encéphalique (Charlier, Nielsen et al. 2009; Casadevall 2010). Plus rarement, *Cryptococcus* est aussi capable de faire des transferts latéraux, de phagocyte infecté vers phagocyte non-infecté, autant chez l'homme que chez la

souris, et ce mécanisme dépend du contact entre deux macrophages et de la polymérisation d'actine (Alvarez and Casadevall 2007; Ma, Croudace et al. 2007).

Comme il est un pathogène intracellulaire facultatif, chez l'homme comme chez la souris, *Cryptococcus* peut être expulsé des phagocytes sans provoquer la mort des deux cellules *in vitro* et *in vivo* (Ma, Croudace et al. 2006; Nicola, Robertson et al. 2011). En effet, il y a maturation et perméabilisation du phagosome qui contient les levures, fusion avec la membrane plasmique du phagocyte et les levures sont expulsées dans l'espace extracellulaire (Ma, Croudace et al. 2006). Ce phénomène, qui peut être observé aussi tôt que 2 heures après l'infection, s'opère autant chez *C. neoformans* que chez *C. gattii* et il y a formation d'une large vacuole dans le phagocyte après l'extrusion qui représente probablement l'accumulation des dommages à long terme résultant du séjour des levures dans ce dernier (Alvarez and Casadevall 2006; Alvarez and Casadevall 2007). Le mécanisme précis de l'extrusion des levures de *C. neoformans* et de *C. gattii* est différent. En effet, des chercheurs ont noté que *C. neoformans var. grubii* était expulsé individuellement (une levure à la fois), alors que *C. gattii* et *C. neoformans var. neoformans* étaient expulsés en biofilms remplis d'anticorps (Alvarez, Saylor et al. 2008). Quelques instants avant l'expulsion, il y a polymérisation d'actine autour du phagosome et le cytosquelette se contracte, tentant d'empêcher l'expulsion des levures (Alvarez and Casadevall 2006; Johnston and May 2010). Le phagocyte peut donc temporairement prévenir l'expulsion, ce qui pourrait jouer un rôle dans la prévention de l'infection du SNC. Il est intéressant de noter que l'expulsion s'effectue aussi chez les amibes (Chrisman, Alvarez et al. 2010).

Par ailleurs, si *Cryptococcus* n'a pas atteint le cerveau en employant la méthode du Cheval de Troie, il peut traverser la barrière hémato-encéphalique par transcytose. Ce processus permet la transmigration directe de levures viables à travers l'endothélium des capillaires corticaux (Charlier, Chretien et al. 2005; Casadevall 2010). Les levures ne roulent pas et n'adhèrent pas à l'endothélium, mais semblent rester coincées dans les capillaires en raison de leur grande taille, relative à celle des capillaires (Shi, Li et al. 2010). Suite à cette micro-embolie de *Cryptococcus* dans les

capillaires, il se produit une déformation des levures, soit un froissement de la membrane, changement dans la structure nucléaire et gonflement des mitochondries et du réticulum-endoplasmique, menant finalement à la transmigration (Chen, Stins et al. 2003; Casadevall 2010). D'ailleurs, ce passage semble dépendre de l'expression par *Cryptococcus* de l'uréase, un facteur de virulence important qui sera traité ultérieurement (Casadevall 2010; Shi, Li et al. 2010). L'acide hyaluronique de *Cryptococcus*, encodé par le gène CPS1, interagit avec le CD44 des radeaux lipidiques des cellules endothéliales du cerveau, ce qui active PKC- $\alpha$  (migration des cellules endothéliales) et DYRK3 (joue un rôle dans l'endocytose) (Jong, Wu et al. 2008; Huang, Long et al. 2011). Cette interaction est essentielle à la transcytose, puisqu'elle provoque l'altération des jonctions serrées au niveau des cellules endothéliales, formation de protrusions semblables à des microvilli et internalisation des levures via une voie trans-cellulaire (Chen, Stins et al. 2003; Chang, Stins et al. 2004).

### Facteurs de virulence

*Cryptococcus* possède trois facteurs de virulence principaux : une capacité de croissance à 37°C, la synthèse de mélanine et la formation d'une capsule.

### Croissance à 37°C

*C. neoformans* et *C. gattii* sont les seuls *Tremellalles* capables de pousser de façon optimale à une température au-dessus de 30°C (Perfect 2006). Ceci leur confère donc un avantage au niveau de l'établissement d'une infection, puisque la température corporelle de l'homme est de 37°C. Plus de 20 gènes ont été démontrés comme nécessaires à la croissance à 37°C et probablement beaucoup d'autres n'ont pas encore été découverts (Perfect 2006). Les protéines Ras contrôlent l'activation de beaucoup de cascades de signalisation et Ras1 est un régulateur central chez *C. neoformans* de la réponse des phéromones pour la reproduction, la fructification

monocaryotique ainsi que pour la croissance à 37°C (Alspaugh, Cavallo et al. 2000; Vallim, Nichols et al. 2005). Une protéine G, Rac1, activée à l'intérieur des cascades de Ras1, agit avec Ste20, une PKA kinase qui joue un rôle dans la fructification monocaryotique et la reproduction, afin de contrôler la croissance à de hautes températures (Vallim, Nichols et al. 2005). Le facteur d'échange de guanine Cdc24, de la famille des protéines Ras est aussi important pour la croissance à 37°C, puisqu'il est un effecteur de Ras1 (Nichols, Perfect et al. 2007). La calcineurine, phosphatase activée par le calcium, joue aussi un rôle critique pour la croissance à 37°C chez *C. neoformans* (Kraus, Nichols et al. 2005). Sans elle, les souches sont avirulentes. Le manganèse super-oxyde dismutase (Sod2), qui gère les concentrations de ROS (*reactive oxygen species*) dans les mitochondries, a aussi été démontré comme essentiel à la croissance à 37°C (Giles, Batinic-Haberle et al. 2005). Le remodelage de la membrane est un important facteur de survie à des températures physiologiques. Le facteur de transcription Mg2, qui agit sur les gènes qui encodent la synthèse des acides lipidiques dans la membrane, est up-régulé à 37°C (Kraus, Boily et al. 2004). La sous-unité 1 du cytochrome c oxydase, qui joue un rôle dans la production d'énergie, est aussi up-régulée chez la souche H99 de *C. neoformans* à 37°C (Toffaletti, Del Poeta et al. 2003). ROM2, qui participe à l'organisation des microtubules et de l'actine à des températures élevées, est aussi nécessaire pour la survie à 37°C (Tang, Breger et al. 2005; Fuchs, Tang et al. 2007). Enfin, Cdc42, qui régule la morphogénèse cellulaire et qui agit dans la cascade de Ras1, est aussi nécessaire puisqu'il est up-régulé à des températures élevées chez *C. neoformans* (Ballou, Nichols et al. 2010).

### Synthèse de mélanine

La mélanine est une substance brun foncé à noir qui se loge dans la membrane cellulaire et protège contre la phagocytose par les amibes, les enzymes hydrolytiques de microbes et les rayons UV dans l'environnement (Rosas and Casadevall 2001; Langfelder, Streibel et al. 2003; Frases, Salazar et al. 2007; Eisenman, Frases et al. 2009). De plus, elle protège aussi *C. neoformans* et *C. gattii* contre les températures

extrêmes, le stress oxydatif et les métaux lourds (Frases, Salazar et al. 2007). La laccase (LAC1) est requise pour synthétiser la mélanine à partir de composés phénoliques, soit les précurseurs de la catécholamine L-DOPA, l'épinéphrine et la norépinéphrine, et le processus de synthèse passe par la cascade cAMP (Langfelder, Streibel et al. 2003; Frases, Salazar et al. 2007). Le cerveau contient ces composés phénoliques, ce qui pourrait expliquer en partie le neurotropisme de *Cryptococcus* (Nosanchuk, Rosas et al. 2000). De plus, lorsqu'elle est présente dans le cerveau, la mélanine entraîne une infection létale avec destruction massive des tissus et une sécrétion minimale de cytokines (Liu and Nizet 2009). La mélanisation dépend aussi de plusieurs autres facteurs, soit les chaperones (Atx1) et transporteurs de cuivre (Ccc2), PI3K, la chitine synthase Chs3, le co-activateur de transcription Mbf1 et l'enzyme Snf5 qui joue un rôle dans le remodelage de la chromatine (Walton, Idnurm et al. 2005). Lors de l'infection pulmonaire des souris, la présence de mélanine entraîne une augmentation de la charge fongique dans les poumons, une réduction de la phagocytose, une augmentation de l'expression de l'IL-4 ainsi que de CCL2 (MCP-1) qui attire les leucocytes (Mednick, Nosanchuk et al. 2005). Puisqu'elle est chargée négativement, elle peut aussi neutraliser les défensines des neutrophiles (Liu and Nizet 2009). À noter qu'elle réduit aussi la production de TNF- $\alpha$  par les macrophages alvéolaires et protège la levure contre les protéines microbicides des leucocytes, entraînant donc une réduction de la réponse inflammatoire (Jacobson 2000; Liu and Nizet 2009). Elle peut aussi réduire le fer, empêchant son utilisation par les macrophages et donc augmenter ses chances de survie (Liu and Nizet 2009). Le système du complément est activé de façon alternative par la mélanine (Gomez and Nosanchuk 2003).

### La capsule

La capsule est le facteur de virulence le plus important chez *C. neoformans* et *C. gattii*. Elle procure une barrière physique en empêchant la phagocytose, inhibe la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, réduit la production d'anticorps, empêche la reconnaissance par le complément, aide à la résistance aux ROS et au NO et réduit

la migration des leucocytes, prévient l'activation et la maturation des cellules dendritiques en down-régulant les CMH I et II et CD83 et favorise la prolifération des cellules T CD4<sup>+</sup> et l'induction d'une réponse Th2 non-protectrice (Almeida, Andrade et al. 2001; Bose, Reese et al. 2003; Vecchiarelli, Pietrella et al. 2003; Lupo, Chang et al. 2008; Zaragoza, Chrisman et al. 2008; De Jesus, Nicola et al. 2009; Cordero, Frases et al. 2011). Dans le cerveau, la capsule inhibe grandement la réponse en cytokines et chimiokines induite par les cellules microgliales (Goldman, Song et al. 2001). Elle se lie aussi au CD18 sur les neutrophiles, inhibant ainsi l'adhésion de ces derniers sur l'endothélium et donc la migration vers les sites d'infection (Dong and Murphy 1997). D'ailleurs, des chercheurs ont noté une plus grande infiltration de PMNs chez *C. neoformans* comparativement à *C. gattii*, indiquant que *C. gattii* est plus efficace pour inhiber la migration des neutrophiles (Dong and Murphy 1995; Cheng, Sham et al. 2009). Elle peut aussi augmenter l'expression du CTLA-4 sur les cellules T CD4<sup>+</sup>, ce qui réduit la production d'IL-2, d'IFN- $\gamma$  et inhibe la prolifération des cellules T (Pietrella, Perito et al. 2001). Elle prévient aussi l'activation classique du complément en empêchant une trop grande accumulation de composants C3 et en modifiant la localisation de ce dernier sur elle-même (Kozel, Wilson et al. 1991; Kozel 1996; Zaragoza, Taborda et al. 2003). Elle peut par contre activer le complément de façon alternative et par la cascade lectine (Merishon-Shier, Vasuthasawat et al. 2011). Il est aussi intéressant de noter que *C. gattii* n'active pas aussi bien la cascade du complément que *C. neoformans* (Merishon, Vasuthasawat et al. 2009). Il pourrait donc y avoir une abrogation presque complète de la protection par le système du complément chez *C. gattii*.

La capsule est composée de deux polysaccharides principaux : le glucuronoxylomannane (GXM), et le galactoxylomannane (GalXM) (Bose, Reese et al. 2003).

Le GXM compose 90% de la capsule et ce sont les altérations de sa structure qui prédisent le sérotype (Bose, Reese et al. 2003). Il joue plusieurs rôles dans la virulence de *Cryptococcus*. Il induit la perte de la L-sélectine, interfère avec l'E-sélectine, CD14 et TLR4 et camoufle la liaison C5a du complément ce qui inhibe la

migration des PMNs (Ellerbroek, Hoepelman et al. 2002; Monari, Kozel et al. 2002). À noter qu'il provoque aussi la perte de la L-sélectine sur les cellules T (Dong, Jackson et al. 1999). Même après sécrétion de CXCL8 (IL-8) dans le cerveau, les neutrophiles sont incapables de s'y rendre en raison du GXM qui down-régule la sécrétion de CXCL8 et du CXCL1 (Lipovsky, Gekker et al. 1998; Guillot, Carroll et al. 2008). La 6-O-acétylation, modification chimique du GXM par substitution d'un 1-3- $\alpha$ -D-mannane par de l'acide glucuronique, est aussi cruciale pour inhiber la migration des neutrophiles (Ellerbroek, Lefeber et al. 2004). Le GXM induit la production de TNF- $\beta$  et peut inhiber directement la prolifération des cellules T en empêchant la progression du cycle cellulaire et en down-régulant l'expression du CMH II et de B7 (Monari, Bistoni et al. 2006; Yauch, Lam et al. 2006; Villena, Pinheiro et al. 2008). De plus, il augmente la sécrétion d'IL-10 et d'IL-4 et réduit la sécrétion du TNF- $\alpha$ , le l'IL-12 et de l'IFN- $\gamma$ , favorisant ainsi la persistance de l'infection (Retini, Kozel et al. 2001; Mariano Andrade, Monteiro Almeida et al. 2003). En interagissant avec CD18 et Fc $\gamma$ II, en down-régulant l'activité de la caspase-3 ou alors en inhibant le cycle glycolytique en s'associant avec PFK, GXM peut induire l'apoptose des macrophages (Chiapello, Baronetti et al. 2008; Grechi, Marinho-Carvalho et al. 2011). De plus, il y a suppression de la cycline D1, qui joue un rôle dans la transition des phases du cycle cellulaire, ce qui empêche la croissance des macrophages et encore une fois induction de l'apoptose (Luo and Casadevall 2010). Il peut aussi se lier aux macrophages sans opsonisation via CD14, CD18 et TLR2/4, éliminant ainsi la production de cytokines par les macrophages (Zhou and Murphy 2006).

Quand à lui, le GalXM compose environ 7% de la capsule (Bose, Reese et al. 2003). Il est localisé dans des petites pochettes au pourtour de la capsule et agit surtout comme un exo-polysaccharide plutôt qu'un composant permanent de la capsule (De Jesus, Nicola et al. 2009). GalXM induit la production de TNF- $\alpha$  et de NO par les macrophages, ainsi que la sécrétion d'IFN- $\gamma$  et d'IL-10 (Pericolini, Cenci et al. 2006; Villena, Pinheiro et al. 2008). GalXM peut lui aussi induire l'apoptose des macrophages, mais dans ce cas via l'interaction Fas / FasLigand (Villena, Pinheiro et al. 2008). En interagissant avec CD7, CD43, CD45 et en activant la caspase-8,

GalXM peut entraîner l'apoptose des lymphocytes T (Pericolini, Cenci et al. 2006; De Jesus, Nicola et al. 2009). Il peut aussi induire la déplétion et l'apoptose des cellules B en down-régulant la production de cytokines et en interagissant avec Fas / FasL (De Jesus, Nicola et al. 2009).

Enfin, les mannoprotéines sont le troisième composant, quoique minime, de la capsule (Bose, Reese et al. 2003). Leur localisation dans la capsule est encore inconnue (Janbon 2004). La mannoprotéine-4 réduit l'expression de la L-sélectine et la perte du récepteur de TNF sur les neutrophiles (Coenjaerts, Walenkamp et al. 2001).

Les gènes CAP (CAP59, CAP10, CAP60, CAP64) et CAS sont essentiels à la synthèse de la capsule et la cascade cAMP en régule la production (Janbon 2004; Okabayashi, Hasegawa et al. 2007).

Une faible concentration en fer, l'altération du pH, une haute concentration de CO<sub>2</sub>, et la présence de sérum induisent la formation et l'élargissement de la capsule (Bose, Reese et al. 2003; Zaragoza, Fries et al. 2003). L'élargissement s'effectue par l'ajout de polysaccharides d'un diamètre plus grand que les dernières au pourtour de la capsule et est contrôlé par la cascade cAMP et Ras1 (Zaragoza, Fries et al. 2003; Yoneda and Doering 2008; Frases, Pontes et al. 2009). Il y a formation de trois zones définies par leur densité, la plus dense étant celle la plus près de la levure (Frases, Pontes et al. 2009). La structure et l'épaisseur de la capsule varient selon le lieu de la levure chez l'hôte, par exemple la capsule est plus mince dans le cerveau et plus épaisse dans les poumons (Charlier, Chretien et al. 2005). Puisque les souches de *Cryptococcus* varient dans la composition de leur capsule, il est important de noter que c'est cette caractéristique qui confère à certaines souches une meilleure survie chez l'hôte, puisque des chercheurs ont constaté que lorsqu'ils infectent un hôte avec plusieurs souches, dans chaque organe infecté, il y a sélection des souches les mieux adaptées à cet organe (Garcia-Hermoso, Dromer et al. 2004). Les souches qui possèdent une capsule plus mince, par exemple *C. gattii* R265, la principale souche responsable de l'éclosion de cryptococcose en Colombie-Britannique, induisent une plus forte réponse inflammatoire dans les poumons, une plus grande production de



NO par les macrophages et ainsi la présence de grosses lésions granulomateuses dans les poumons (Fonseca, Nohara et al. 2010; Gupta and Fries 2010). Il est donc important de noter que dans les mêmes conditions environnementales, les isolats cliniques agissent différemment (Alanio, Desnos-Ollivier et al. 2011). La souche joue donc aussi un rôle dans la pathogénèse.

#### Autres facteurs de virulence importants

La sécrétion d'enzymes extracellulaires (laccase, phospholipase et uréase) est aussi un facteur de virulence important chez *C. neoformans* et *C. gattii*. Seules ces deux espèces de *Cryptococcus* produisent la laccase (Chan and Tay 2010). La laccase est retrouvée dans le cytoplasme, la membrane cellulaire et la capsule (Garcia-Rivera, Tucker et al. 2005). Elle contribue à la virulence par la synthèse de mélanine en utilisant des composés phénoliques et des flavonoïdes des plantes dans l'environnement (Eisenman, Mues et al. 2007; Fowler, Baron et al. 2011). Son activité d'acquisition et d'oxydation du fer des macrophages diminue la poussée oxydative de ces derniers, ce qui permet d'augmenter les chances de dissémination extra-pulmonaire (Liu, Tewari et al. 1999; Noverr, Williamson et al. 2004; Zhu and Williamson 2004; Garcia-Rivera, Tucker et al. 2005). CUF1 (*copper responsive factor*) joue un rôle dans l'induction de LAC1 et donc de l'activité enzymatique de la laccase (Jiang, Sun et al. 2009). LAC1 est inductible dans deux conditions : en faible concentration de glucose et en haute concentration de cuivre (Zhu and Williamson 2004; Jiang, Sun et al. 2009). Les gènes impliqués dans la régulation de la laccase sont IPC1, GPA1, MET3 et STE12 (Noverr, Williamson et al. 2004).

*Cryptococcus* sécrète aussi des phospholipases, dont la phospholipase B (PLB) et cette dernière est activée à son maximum entre 25°C et 40°C (Santangelo, Nouri-Sorkhabi et al. 1999). La PLB joue un rôle dans la biogénèse et le remodelage de la membrane de la levure. On la retrouve associée à une ancre GP1 sur les radeaux lipidiques de la membrane cellulaire et elle maintient l'intégrité de cette dernière à de hautes températures (Djordjevic, Del Poeta et al. 2005; Siafakas, Wright et al. 2006;

Siafakas, Sorrell et al. 2007). La PLB peut se lier au DPPC (di-palmitoyl-phosphatidylcholine) et PG (phosphatidylglycérol) des cellules épithéliales du poumon et hydrolyser les phospholipides à la surface de celles-ci, augmentant ainsi la pénétration des levures et la dissémination (Santangelo, Nouri-Sorkhabi et al. 1999; Santangelo, Zoellner et al. 2004; Ganendren, Carter et al. 2006; Djordjevic 2010). La PLB1 est requise pour l'incorporation de l'acide arachidonique des macrophages par la levure, assurant une production par LAC1 d'écossanoïdes (prostaglandines et leucotriènes) qui sont anti-inflammatoires ( $\downarrow$ TNF- $\alpha$ ,  $\uparrow$  IL-10) (Noverr, Phare et al. 2001; Noverr, Cox et al. 2003; Shea, Henry et al. 2006; Wright, Santangelo et al. 2007; Erb-Downward, Noggle et al. 2008; Djordjevic 2010; Singh, Qureshi et al. 2011). De plus, PLB1 participe à l'extrusion des levures des macrophages puisqu'il dissout la membrane des phagolysosomes qui hébergent *Cryptococcus* (Djordjevic 2010). La sécrétion de PLB1 est dépendante de SEC14, qui régule les cascades d'exportation trans-Golgi et s'effectue à partir des cascades PKC / MAPK (Kozubowski, Lee et al. 2009; Chayakulkeeree, Johnston et al. 2011). Une autre phospholipase, ISC1, protège *C. neoformans* du stress acide, oxydatif et nitrique des macrophages (Shea, Henry et al. 2006). La PLB1 de *C. gattii* est identique à 85% à celle de *C. neoformans* au niveau des séquences d'ADN (Latouche, Sorrell et al. 2002). Elle a une plus grande masse moléculaire, une plus grande activité comparativement à la PLB1 de *C. neoformans*, et est spécifique pour le DPPC, tandis que la PLB1 de *C. neoformans* se lie à une variété de phospholipides (Wright, Payne et al. 2004). Une nouvelle phospholipase, LPL1, a été caractérisée chez *C. gattii*, ce qui pourrait contribuer à sa virulence (Wright, Payne et al. 2004).

L'uréase est un facteur important de virulence de *Cryptococcus*, surtout dans l'infection du cerveau (Cox, Mukherjee et al. 2000). La transmigration vers le cerveau est uréase-dépendante et dépend du gène URE1 (Osterholzer, Surana et al. 2009; Shi, Li et al. 2010). L'uréase entraîne la séquestration de *Cryptococcus* dans les micro-capillaires à la barrière hémato-encéphalique, probablement par la synthèse d'ammonium qui est très dommageable pour l'endothélium, facilitant donc l'invasion du cerveau (Olszewski, Noverr et al. 2004; Shi, Li et al. 2010). L'infection de souris avec des souches de *Cryptococcus* productrices d'uréase résulte en l'augmentation

dans les poumons du recrutement d'éosinophiles, de sécrétion d'IgE, d'IL-4 et IL-13, de l'activation alternative des macrophages et de l'augmentation du recrutement de cellules dendritiques immatures, bref l'apparition d'une réponse Th2 non-protectrice (Osterholzer, Surana et al. 2009).

#### Autres facteurs impliqués dans la virulence

Mis à part les facteurs de virulence principaux, d'autres acteurs, tout aussi importants, contribuent à la virulence de *C. neoformans* et *C. gattii*.

L'autophagie, qui est une réponse au stress extra et intracellulaire dans laquelle les cellules recyclent du cytoplasme et des organelles défectueuses, est impliquée dans la virulence de *Cryptococcus* (Palmer, Askew et al. 2008). Lorsque *Cryptococcus* réside dans les macrophages, ce milieu est très pauvre en nutriments et *Cryptococcus* a besoin de l'autophagie pour y survivre (Palmer, Askew et al. 2008). Ce processus dépend du signalement par la PI3K, qui joue un rôle dans le transport vésiculaire des hydrolases vacuolaires et l'autophagie (Palmer, Askew et al. 2008). Atg8, une protéine essentielle à l'autophagie, est aussi up-réglée dans le cerveau humain lors de l'infection à *C. neoformans*, suggérant que l'autophagie est aussi importante lorsque la levure réside dans le cerveau (Palmer, Askew et al. 2008). De fait, les cellules *Drosophila S2* représentent un excellent modèle pour l'étude de l'autophagie de *C. neoformans* (Qin, Luo et al. 2011).

Les anhydrases carboniques, des métalloenzymes qui catalysent la conversion de CO<sub>2</sub>, jouent un rôle dans la régulation des niveaux de CO<sub>2</sub>, ce qui permet la survie de la levure (Elleuche and Poggeler 2010). Elles jouent aussi un rôle dans la régulation de la biosynthèse de la capsule, de la filamentation et de l'adaptation à des niveaux de pH différents (Innocenti, Hall et al. 2010). Les adénylyl cyclases jouent aussi un rôle dans la régularisation du CO<sub>2</sub> chez *Cryptococcus* (Klengel, Liang et al. 2005; Bahn and Muhlschlegel 2006).

Gcn5, qui régule le remodelage de la chromatine, aide à la survie à de hautes températures, au stress oxydatif ainsi qu'à l'attachement de la capsule à la surface de la levure (O'Meara, Hay et al. 2010). De plus, les chercheurs ont constaté un énorme niveau de réarrangement des chromosomes entre *C. neoformans* et *C. gattii*, et entre diverses souches de *C. gattii*, ce qui pourrait contribuer à la virulence particulière de ces deux espèces (D'Souza, Kronstad et al. 2011).

Le glucosylcéramide se retrouve à la surface cellulaire de *Cryptococcus* et joue un rôle dans la survie à pH élevé (Rittershaus, Kechichian et al. 2006; Rhome, McQuiston et al. 2007). Les mécanismes spécifiques sont encore méconnus, mais il est établi qu'il est nécessaire à la progression du cycle cellulaire et à la croissance des levures, et qu'il est essentiel à la croissance à des niveaux de CO<sub>2</sub> non-permissifs (Mitchell 2006; Rittershaus, Kechichian et al. 2006).

*Cryptococcus* doit aussi s'adapter aux différentes conditions d'oxygénation des tissus et deux cascades qui régulent ceci ont été identifiées : une homologue au *sterol response element binding protein cholesterol biosynthesis pathway* (SREBP), et l'autre qui implique Tco1, une histidine kinase (Chun, Liu et al. 2007; Ernst and Tielker 2009; Moranova, Kawamoto et al. 2009).

L'homéostasie du cuivre, régulée par le transporteur de cuivre Ctr2 (Ctr4 dans le cerveau) et le gène CUF1, qui régule l'acquisition du cuivre et la détoxification, est aussi importante à la virulence de *Cryptococcus* puisqu'elle est liée à la production de la capsule et l'inhibition de la phagocytose (Kim, Nevitt et al. 2008; Chun and Madhani 2010). Les concentrations en fer ont une influence sur la formation de la capsule et la production de mélanine (Jung and Kronstad 2008). *Cryptococcus* acquiert du FeIII par des réductases, des ferroxidases (Cfo1) et des sidérophores (Howard 1999; Jung and Kronstad 2008; Jung, Hu et al. 2009). Cir1 (régulateur de l'absorption du fer) et HapX (contrôle l'expression de gènes qui ont besoin de la présence de fer) sont importants dans la régulation du fer par *C. neoformans* et *C. gattii* (Jung, Sham et al. 2006; Jung, Saikia et al. 2010; Jung and Kronstad 2011).

Le mannitol produit par *C. neoformans*, à partir de la mannitol-1-phosphate déshydrogénase (MPD1), est aussi important pour le balayage des radicaux libres (Suvarna, Bartiss et al. 2000; Guimaraes, Frases et al. 2010). Il est aussi présent dans le LCR des patients infectés au VIH-1 et atteints de cryptococcose neuro-méningée et est souvent le signe d'infection massive du cerveau (Megson, Stevens et al. 1996; Liappis, Kan et al. 2008).

Le type sexuel de *Cryptococcus* joue aussi un rôle dans sa virulence. En effet, la majorité des souches cliniques est de type  $\alpha$  (Nielsen, Cox et al. 2005). Il y a corrélation entre la virulence et le type  $\alpha$ , puisque les souches du type  $\alpha$  sont peu ou pas virulentes (Barchiesi, Cogliati et al. 2005). Les souches  $\alpha$  ont d'ailleurs une plus grande prédilection à infecter le SNC (Nielsen, Cox et al. 2005). De plus, STE12 $\alpha$ , retrouvé uniquement chez les souches de type  $\alpha$ , contrôle l'expression de plusieurs facteurs de virulence, par exemple la capsule et la mélanine (Chang, Wickes et al. 2000).

Des mitochondries fonctionnelles sont importantes pour la respiration (Ingavale, Chang et al. 2008). D'ailleurs, le très haut niveau de recombinaison entre les souches environnementales, vétérinaires et cliniques, ainsi que l'up-régulation constante d'un très grand nombre de gènes encodés par les mitochondries ont probablement contribué à la naissance de la souche *C. gattii* R265, qui est majoritairement responsable de l'éclosion de cryptococcose chez les sujets immunocompétents en Colombie-Britannique (Bovers, Hagen et al. 2009; Ma and May 2010).

La cascade PKC1-MAPK est essentielle pour la protection de *Cryptococcus* contre le stress nitrique, ce qui n'a été confirmé chez aucun autre organisme (Gerik, Bhimireddy et al. 2008).

Chez *Cryptococcus*, les gènes de la voie de signalisation de la calcineurine, GPA1, PKA1 et RAS1, régulent les trois facteurs de virulence principaux, soit la capsule, la mélanine et la croissance à 37°C (Alspaugh, Perfect et al. 1997; Odom, Muir et al. 1997; Alspaugh, Cavallo et al. 2000; D'Souza, Alspaugh et al. 2001; Toffaletti, Del Poeta et al. 2003; Pukkila-Worley and Alspaugh 2004). Les cascades MAPK

contrôlent la biogenèse de la capsule, la reproduction, la fructification et la réponse au stress (Kozubowski, Lee et al. 2009).

Les super oxydes dismutases (SODs) convertissent les radicaux libres, mortels pour *Cryptococcus*, en peroxyde d'hydrogène et oxygène (Cox, Harrison et al. 2003; Frealle, Noel et al. 2005). Sod1 encode les super oxydes dismutases pour le cuivre et le zinc (Cox, Harrison et al. 2003). Les SODs de cuivre et de zinc sont primordiales pour *C. gattii*, puisqu'elles jouent un rôle dans la survie contre les neutrophiles humains ainsi que dans l'expression de la laccase, de l'uréase et de la phosphatase (Narasipura, Ault et al. 2003).

L'inositol est un précurseur des phosphatidylinositols, un élément essentiel pour maintenir l'intégrité de la membrane de *Cryptococcus* (Reynolds 2009). Le SNC est riche en inositol et c'est probablement à cet endroit que *Cryptococcus* se l'approprie (Reynolds 2009). Ceci pourrait expliquer en partie le neurotropisme de cette levure.

Le bon fonctionnement du Golgi est aussi essentiel à la virulence et à la survie de *Cryptococcus*. La *Golgi Reassembly and Stocking Protein* (GRASP) régule la sécrétion non-conventionnelle de protéines (Kmetzsch, Joffe et al. 2011). Elle est essentielle à la sécrétion des vésicules extracellulaires de *Cryptococcus* (Kmetzsch, Joffe et al. 2011).

La cascade du tréhalose, contrôlée par TSP1 et TSP2, est essentielle pour *C. gattii* puisqu'elle régule la sécrétion de protéines, la reproduction et l'intégrité de sa membrane (Ngamskulrunroj, Himmelreich et al. 2009).

Sur les plantes, *C. gattii* produit des fibrilles extracellulaires. Les souches capables de produire ces fibrilles possèdent une virulence accrue dans des modèles murins de cryptococcose (Springer, Ren et al. 2010). D'autres études seront nécessaires pour établir la présence de ces fibrilles lors de l'infection chez l'homme.

Enfin, le gène ACS1 qui contrôle le métabolisme de l'acétyl-CoA est aussi up-régulé et requis pour la virulence de *C. neoformans* (Hu, Cheng et al. 2008).

### Immunité contre *Cryptococcus*

Le système immunitaire de l'hôte est très polyvalent et possède la capacité de reconnaître une grande diversité de pathogènes, et de contenir et d'éliminer les infections. Avant de rejoindre les poumons, *Cryptococcus* doit tout d'abord traverser les voies nasales parsemées de poils, échapper à l'action ciliaire de l'arbre bronchique, et résister à la toux et les éternuements qui chassent les corps étrangers et les pathogènes, entourés de mucus, hors des voies respiratoires (Kindt, Goldsby et al. 2007). Chez l'homme, des histatines présentes dans la salive ont une activité fongicide envers les levures (Tsai and Bobek 1998). De plus, seules les plus petites levures ou spores vont pouvoir se rendre aux alvéoles et capillaires pour s'y loger.

Les pneumocytes de type II qui tapissent les alvéoles reconnaissent *Cryptococcus*. Ces cellules épithéliales sécrètent du CCL2, ce qui permet le recrutement des monocytes et lymphocytes T à la zone d'infection. Les collectines de type C, SP-A et SP-D, produites par les cellules alvéolaires jouent un rôle dans l'immunité en facilitant l'agrégation, la phagocytose et l'activité fongicide des phagocytes (Geunes-Boyer, Oliver et al. 2009; Brummer and Stevens 2010). Ceci ne s'applique par contre qu'aux souches dépourvues de capsule, puisque cette dernière empêche la liaison de SP-D sur *C. neoformans* et qu'en présence de celle-ci, SP-A n'agit pas comme une opsonine pour les phagocytes (Walenkamp, Verheul et al. 1999; Geunes-Boyer, Oliver et al. 2009). Les cellules épithéliales pulmonaires sécrètent aussi le TGF- $\beta$  en réponse à *C. neoformans* (Shao, Rivera et al. 2005). La cytokine TGF- $\beta$  est impliquée dans la pathogénèse de plusieurs infections chroniques et joue un rôle dans la persistance des infections en interférant avec les fonctions des macrophages (Shao, Rivera et al. 2005). Lors de l'infection par *C. neoformans*, le TGF- $\beta$  joue un double rôle de protection en augmentant la sécrétion de lysosymes par les macrophages, et en limitant l'inflammation par l'inhibition de la phagocytose par les monocytes et macrophages et en réduisant la production de chimiokines et l'intensité de la poussée oxydative (Shao, Rivera et al. 2005). Chez l'homme, la présence de cellules sans capsule de *C. neoformans*, et la reconnaissance du GXM par le CD14, induit la production de CXCL8 et de CXCL1 par les cellules épithéliales, ce qui augmente le

recrutement et l'activité des neutrophiles (Barbosa, Fonseca et al. 2007; Guillot, Carroll et al. 2008).

### Macrophages alvéolaires

Les premières cellules immunitaires rencontrées par *Cryptococcus* après son entrée dans les poumons sont les macrophages alvéolaires. Durant l'hématopoïèse dans la moelle osseuse, des progéniteurs granulocytes-monocytes se différencient en promonocytes et entrent dans la circulation sanguine (Kindt, Goldsby et al. 2007). Il y a ensuite maturation en monocytes. Lorsque ces derniers migrent de la circulation sanguine vers les différents tissus, ils se différencient localement en macrophages intestinaux dans le tube digestif, alvéolaires dans les poumons, histiocytes dans les tissus connectifs, en cellules de Kupffer dans le foie, mésangiales dans les reins, microgliales dans le cerveau et enfin en ostéoclastes dans les os (Kindt, Goldsby et al. 2007). La phagocytose par les macrophages peut être initiée par l'adhérence à un pathogène microbien, à des particules de virus, et aux anticorps ou à des molécules du complément liés à des pathogènes et jouant le rôle d'opsonines (Kindt, Goldsby et al. 2007).

Il a été démontré que les macrophages possèdent la capacité de reconnaître le GXM capsulaire de *Cryptococcus* (Chang, Netski et al. 2006). La chitosane présente dans la paroi peut être reconnue par les macrophages humains, sans pour autant initier une réponse inflammatoire (Gorzelanny, Poppelmann et al. 2010). La reconnaissance s'effectue généralement par la liaison des anticorps, liés à *Cryptococcus*, au récepteur F $\gamma$ cR des macrophages, ou des molécules du complément (C3b) au récepteur CR (CR3), mais il a été démontré que les macrophages alvéolaires n'ont pas besoin d'opsonisation pour phagocyter ces levures (Casadevall and Pirofski 2005; Stano, Williams et al. 2009). Les macrophages jouent un rôle de présentation d'antigènes, de séquestration de polysaccharides et de sécrétion de cytokines et chimiokines lors d'une infection (He, Casadevall et al. 2003). En effet chez les macrophages alvéolaires de lapin, des chercheurs ont noté une augmentation de l'activité de



phagocytose, du métabolisme oxydatif et une diminution du pH en réponse au *C. neoformans* après seulement 24h d'infection *in vivo* (Nessa, Gross et al. 1997). Lorsqu'un macrophage vient en contact avec *C. neoformans*, le CMH de classe II, la molécule d'adhésion ICAM-1 et le récepteur FcR, tous des marqueurs d'activation, sont up-régulés (Kawakami, Kohno et al. 1994). Il y a production de CCL2 qui aide au recrutement des monocytes et lymphocytes T (He, Casadevall et al. 2003). Ils produisent aussi du TNF- $\alpha$ , qui provoque la migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques, l'up-régulation de la présentation antigénique et l'induction d'une réponse protectrice contre *Cryptococcus* (Herring, Lee et al. 2002; Bauman, Huffnagle et al. 2003). L'induction de la réponse protectrice dépend entre autres du récepteur de CCL2 sur les macrophages, CCR2, qui aide au recrutement de cette population cellulaire vers le site d'infection (Traynor, Kuziel et al. 2000; Serbina, Jia et al. 2008). La reconnaissance de *Cryptococcus* par le récepteur TLR9 induit la production d'IL-12, ce qui aide à l'établissement de la réponse protectrice (Zhang, Wang et al. 2010). Chez l'homme, il y a production d'IL-1, ce qui aide à la prolifération et l'activation des cellules T (Vecchiarelli, Dottorini et al. 1994). Les macrophages produisent aussi plusieurs ROIs (*Reactive Oxygen Intermediates*) ainsi que des produits non-oxydatifs contre *Cryptococcus* (Schop 2007). Dans un modèle murin où les ROS ont été éliminés, les macrophages sont plus actifs, la réponse protectrice Th1 est plus forte et il y a une amélioration du confinement des levures dans les lésions granulomateuses, suggérant ainsi que l'absence de ROS pourrait empêcher leur utilisation par *Cryptococcus* et donc réduire sa virulence (Snelgrove, Edwards et al. 2006).

Les macrophages peuvent être activés de façon classique par l'IFN- $\gamma$ , ce qui induit une réponse protectrice Th1 envers *Cryptococcus*, et de façon alternative par l'IL-4 et l'IL-13 qui résulte en une réponse non-protectrice Th2 (Hardison, Ravi et al. 2010; Arora, Olszewski et al. 2011). Il est aussi possible, lorsque le ratio IL-4/IFN- $\gamma$  est près de l'égalité, d'observer des macrophages activés de façon intermédiaire, et qui expriment l'arginase-1 (Th2) tout en produisant du NO (Th1) (Arora, Olszewski et al. 2011). En effet, c'est le phénotype d'activation des macrophages et non le nombre de cellules présentes au site d'infection qui prédit la résolution ou la persistance de

l'infection (Hardison, Ravi et al. 2010). Il est intéressant de noter que lors de la cryptococcose du SNC, la présence de macrophages activés de façon alternative est associée à la prolifération incontrôlée de *Cryptococcus* (Stenzel, Muller et al. 2009).

Il a été observé que les macrophages, après la phagocytose de *Cryptococcus*, répondent moins bien aux chimio-attractants (par exemple CX3CL1 et CSF-1), ce qui permettrait à l'hôte de contenir les macrophages infectés au site d'infection et ainsi diminuer la dissémination (Luo, Isaac et al. 2009). Les macrophages activés de façon classique produisent les cytokines IL-6 et IL-23, importantes pour la différenciation des lymphocytes T CD4+ naïfs en cellules Th17, qui participent aussi à la réponse de l'hôte contre *Cryptococcus* (Hardison, Wozniak et al. 2010). Il faut faire mention qu'un autre type de macrophage, celui-ci dérivé des monocytes Ly-6C<sup>high</sup>, recrutés après le début de l'infection, a une capacité supérieure à celle des macrophages alvéolaires à tuer *Cryptococcus* par production de NO (Osterholzer, Chen et al. 2011).

### Éosinophiles

Les éosinophiles sont des granulocytes impliqués dans la réponse immunitaire contre les parasites, par exemple les helminthes, et les réactions allergiques (Garro, Chiapello et al. 2011). Feldmesser et ses collègues ont confirmé l'interaction des éosinophiles avec *C. neoformans* *in vitro* et *in vivo* (Feldmesser, Casadevall et al. 1997). Leur recrutement est médié par la production d'IL-5 par les leucocytes (Huffnagle, Boyd et al. 1998). Il a été récemment démontré qu'ils peuvent jouer un rôle de présentation d'antigènes lors de l'infection par *Cryptococcus* (Garro, Chiapello et al. 2011). En effet, dans un modèle d'infection chez le rat, les éosinophiles phagocytent *C. neoformans* par l'engagement de CD18 et FcγR II, et il y a ensuite activation et sécrétion d'IL-12, TNF-α et IFN-γ, prolifération des lymphocytes T CD4+ et T CD8+ de manière dépendante au CMH II et CMH I respectivement, ce qui entraîne l'apparition d'une réponse Th1 protectrice (Garro, Chiapello et al. 2011). Les éosinophiles peuvent par contre aussi jouer un rôle dans

l'induction de la réponse non-protectrice par une production significative d'IL-4 dans les poumons lors de l'infection (Piehler, Stenzel et al. 2011).

### Cellules dendritiques

Les cellules dendritiques (CDs), découvertes par Ralph Steinman en 1973, sont aussi parmi les premières cellules immunitaires à rencontrer *Cryptococcus* dans les poumons. Il existe deux types majeurs de CDs, myéloïde et plasmacytoïde (Ueno, Palucka et al. 2010). Les CDs plasmacytoïdes jouent un rôle dans l'immunité antivirale en produisant de l'interféron de type I (Ueno, Palucka et al. 2010). Les CDs myéloïdes, pour leur part, composent plusieurs populations spécifiques dont les cellules de Langerhans et les CDs dermiques impliqués dans la présentation antigénique et l'induction de la réponse immunitaire adaptative (Kindt, Goldsby et al. 2007; Ueno, Palucka et al. 2010). Toutes les populations de CDs possèdent les molécules CMH I et II ainsi que les molécules co-stimulatrices CD80 et CD86 (Kindt, Goldsby et al. 2007; Ueno, Palucka et al. 2010). Elles sont aussi munies de CD40, molécule qui cause l'activation des lymphocytes B et T après interaction avec le CD40L (Kindt, Goldsby et al. 2007). Les CDs immatures capturent les antigènes étrangers par phagocytose, endocytose ou pinocytose, mûrissent et migrent vers les ganglions lymphatiques pour présenter les antigènes aux lymphocytes T (Kindt, Goldsby et al. 2007).

Osterholzer et ses collègues ont démontré que la présence des cellules dendritiques est essentielle à la survie de souris infectées par *Cryptococcus* (Osterholzer, Milam et al. 2009). Sans les CDs, il y a mortalité causée par une accumulation excessive de neutrophiles et de lymphocytes B entraînant un dommage des tissus. Les cellules dendritiques ont la capacité de reconnaître *C. neoformans* opsonisé par des anticorps ou des molécules du complément, de phagocyter et tuer les levures, et de présenter des antigènes (Kelly, Chen et al. 2005; Wozniak and Levitz 2008). En effet, il a été démontré que suite à la phagocytose, *C. neoformans* entre dans la voie endosome-lysosome et est tué par les composants des lysosomes (Wozniak and Levitz 2008).

CCR2 est important pour le recrutement des CD4<sup>+</sup> au site d'infection et la co-stimulation par CD40 / CD40L, qui initie plusieurs signaux d'activation chez les CD4<sup>+</sup> elles-mêmes, est essentielle à la protection contre *C. neoformans* (Pietrella, Lupo et al. 2004). Il est important de noter que des chercheurs ont récemment démontré que CD40 pouvait aussi promouvoir des éléments de la réponse Th2 en présence d'infection persistante (Chen, Osterholzer et al. 2010). Suite à la reconnaissance de *Cryptococcus*, il y a tout d'abord up-régulation sur les CD4<sup>+</sup> de deux ligands de CCR2, le CCL2 et le CCL7, suivi du recrutement pulmonaire des CD4<sup>+</sup> et leur co-localisation avec les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> dans les infiltrats broncho-vasculaires, entraînant la production d'IL-12 et d'IFN- $\gamma$  et l'induction d'une réponse protectrice contre *Cryptococcus* (Osterholzer, Curtis et al. 2008). Bien que les mannoprotéines sont des ligands pour le récepteur mannose des macrophages, les cellules dendritiques possèdent également ce récepteur, mais sont par ailleurs plus efficaces pour présenter des antigènes aux lymphocytes T (Mansour, Schlesinger et al. 2002; Syme, Spurrell et al. 2002; Mansour, Latz et al. 2006). Les mannoprotéines se lient au récepteur mannose CD206, au récepteur CD209 (DC-SIGN) et au Fc $\gamma$ R II des cellules dendritiques, ce qui augmente l'expression des marqueurs de maturation CD80, CD86 et CMH II ainsi que CD40 et la production d'IL-12, nécessaire à la différenciation des lymphocytes T naïfs vers une réponse protectrice Th1 (Syme, Spurrell et al. 2002; Pietrella, Lupo et al. 2004; Pietrella, Corbucci et al. 2005; Mansour, Latz et al. 2006; Wozniak, Vyas et al. 2006; Dan, Kelly et al. 2008). Chez la souris, les cellules dendritiques provenant de la moelle osseuse peuvent également reconnaître *C. neoformans* à l'aide des récepteurs *Toll-like* TLR9, et possiblement TLR2, mais pas TLR4, déclenchant la cascade d'activation Myd88 et la sécrétion d'IL-12 et d'IL-23, ce qui n'est pas le cas chez les macrophages (Yauch, Mansour et al. 2004; Biondo, Midiri et al. 2005; Nakamura, Miyagi et al. 2006; Netea, Ferwerda et al. 2006; Nakamura, Miyazato et al. 2008; Siegemund and Alber 2008). En effet, le GXM stimule TLR4, mais son activation est incomplète et n'entraîne pas de production de TNF- $\alpha$  (Shoham, Huang et al. 2001; Netea, Van der Graaf et al. 2004). Le type de cellule dendritique présent au site d'infection peut aussi déterminer la réponse contre *Cryptococcus*. Il a été démontré que les cellules dendritiques

lymphoïdes spléniques induisent une réponse non-protectrice envers *C. neoformans*, tandis que les cellules dendritiques myéloïdes spléniques, les cellules de Langerhans, et les cellules dendritiques des ganglions lymphatiques induisent une réponse protectrice (Bauman, Nichols et al. 2000).

### Cellules NK

Les cellules NK sont des lymphocytes remplis de granules et font partie de la réponse innée du système immunitaire (Kindt, Goldsby et al. 2007). Elles peuvent tuer des pathogènes microbiens et moduler l'immunité par leur sécrétion de plusieurs cytokines (Marr, Jones et al. 2006). Elles agissent surtout contre les virus, les tumeurs et les allogreffes (Marr, Jones et al. 2006). Les cellules cancéreuses ou infectées down-régulent les molécules du CMH en surface. Des signaux d'inhibition sont donnés à la cellule NK lorsque le CMH est présent sur une cellule (Marr, Jones et al. 2006). Dans le cas contraire, la cellule NK devient cytotoxique et tue la cellule à laquelle elle s'est liée (Marr, Jones et al. 2006).

Les cellules NK humaines et murines peuvent tuer *Cryptococcus* et ce sans exposition préalable (Hidore, Nabavi et al. 1991; Marr, Jones et al. 2006; Marr, Jones et al. 2009). Il faut noter que les NK de souris sont très actives dans les poumons, tandis que chez l'homme elles sont peu ou pas actives (Marr, Jones et al. 2006). Par contre, les NK humaines sont très actives dans la circulation sanguine et pas du tout chez les souris (Marr, Jones et al. 2006). En effet, il a été démontré que les cellules NK murines ne jouent pas de rôle dans la résistance à l'infection systémique de *C. neoformans* (Salkowski and Balish 1991). Ces différences inter-espèces doivent donc être prises en considération lors de l'extrapolation des fonctions des NK chez l'homme à partir d'études chez les souris.

Un contact direct avec *Cryptococcus* est requis pour que la cellule NK s'active. Il y a alors augmentation de la transcription de perforine et sécrétion de celle-ci (Ma, Wang et al. 2004; Marr, Jones et al. 2009; Petkovic, Arsenijevic et al. 2010). Par contre, il n'y a pas d'augmentation directe de la sécrétion de cytokines par les NKs (Murphy,

Zhou et al. 1997; Marr, Jones et al. 2009). La sécrétion de perforine est dépendante de ERK1 et ERK2 qui font partie de la cascade PI3K (Wiseman, Ma et al. 2007). L'IL-12 sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques et l'IL-18 agissent en synergie pour augmenter la production d'IFN- $\gamma$  par les cellules NK et diminuer la production d'IL-4 (réponse Th2 non-protectrice) dans les poumons (Zhang, Kawakami et al. 1997; Qureshi, Zhang et al. 1999; Kawakami, Koguchi et al. 2000; Kawakami 2002).

Le CCL2 sécrété par les cellules épithéliales des poumons recrute, entre autres, les cellules NKT (Kawakami, Kinjo et al. 2001). Ce sont des cellules distinctes des NK qui expriment autant les marqueurs des NK que les récepteurs des lymphocytes T (Kawakami, Kinjo et al. 2001). Elles jouent un rôle dans la régulation des réactions allergiques, les maladies auto-immunes, les métastases de tumeurs ainsi que dans la protection contre les infections bactériennes et parasitaires (Kawakami, Kinjo et al. 2001). Ces cellules interagissent avec *Cryptococcus* (mécanisme inconnu) et contribuent à la sécrétion de l'IFN- $\gamma$  et donc l'augmentation de la réponse Th1 protectrice (Kawakami, Kinjo et al. 2001; Kawakami, Kinjo et al. 2001; Kawakami, Kinjo et al. 2001).

### Neutrophiles

Les neutrophiles sont produits par hématopoïèse dans la moelle osseuse et sont relâchés dans le système sanguin où ils circulent jusqu'à la migration dans les tissus lors d'une infection (Kindt, Goldsby et al. 2007).

Les polymorphonucléaires neutrophiles (PMNs) jouent un rôle important dans la défense de l'hôte contre *Cryptococcus*. Au cours de l'infection par des souches virulentes de *C. neoformans*, il y a une infiltration massive de PMNs dans les poumons, médiée par la production d'IL-17 par les lymphocytes T, et augmentation de leur activité antimicrobienne (Mednick, Feldmesser et al. 2003; Hardison, Wozniak et al. 2010). Il a été démontré que les PMNs humains sont capables de phagocyter *C. neoformans* (Kozel, Pfrommer et al. 1987). Le *Mannose Binding*

*Lectin* (MBL) est une protéine qui initie la cascade lectine du système du complément. Elle augmente la phagocytose par les PMNs des souches sans capsule de *C. neoformans*, qui possèdent des résidus glycosidiques à leur surface (van Asbeck, Hoepelman et al. 2008). Les neutrophiles peuvent tuer *Cryptococcus* par les voies oxydative ou non-oxydative. La myéloperoxidase (MPO) participe à la réponse oxydative des PMNs contre *Cryptococcus* (Chaturvedi, Wong et al. 1996). En présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, la MPO induit la formation de radicaux hydroxyles (OH) et d'acide hypochloreux (HOCL), toxiques pour *Cryptococcus* et nécessaires à l'élimination initiale dans les poumons (Chaturvedi, Wong et al. 1996; Aratani, Kura et al. 2006). Les PMNs humains possèdent aussi une activité non-oxydative contre *C. neoformans* (Mambula, Simons et al. 2000). Trois fractions majeures des PMNs ont une activité non-oxydative : les granules primaires et secondaires, et le cytoplasme (Mambula, Simons et al. 2000). Après la phagocytose de *C. neoformans* par les PMNs, il y a fusion des granules avec le phagosome. Les granules primaires contiennent les défensines, l'élastase, la cathepsine G, la collagénase, la protéinase B, des facteurs de perméabilité bactériens, l'azurocidine, alors que les granules secondaires contiennent le lysosyme et la lactoferrine (Mambula, Simons et al. 2000). La protéine antimicrobienne du cytoplasme est la calprotectine (Mambula, Simons et al. 2000). Parmi toutes ces substances antimicrobiennes, la calprotectine et les défensines semblent posséder la meilleure activité contre *Cryptococcus*, alors que les autres composants ont une activité variable (Mambula, Simons et al. 2000). La sécrétion des molécules fongicides par les PMNs en réponse au *Cryptococcus* dépend de l'activité de la sphingomyéline synthase (SMS) et de la protéine kinase D, (Qureshi, Subathra et al. 2010).

#### Lymphocytes T CD4+

Les lymphocytes T CD4+ proviennent de la down-régulation du récepteur CD8 chez les thymocytes double positifs dans le thymus (Kindt, Goldsby et al. 2007). Ils circulent dans le sang et les ganglions lymphatiques et s'activent uniquement au contact d'un antigène spécifique présenté par une cellule présentatrice d'antigènes

(Kindt, Goldsby et al. 2007). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> se différencient par la suite en plusieurs sous-populations : les Th1, les Th2, les Th17 et les Treg (Kindt, Goldsby et al. 2007). Les Th1 sécrètent de l'IL-2, de l'IFN- $\gamma$  et du TGF- $\beta$ , responsables de l'activation des lymphocytes cytotoxiques et de la DTH (*delayed type hypersensitivity*), alors que les Th2 sécrètent de l'IL-4, IL-5, IL-6 et IL-10 et aident à l'activation des cellules B (Kindt, Goldsby et al. 2007). La population Th17 joue un rôle dans l'inflammation, les maladies auto-immunes, la défense contre les microorganismes pathogènes, et se différencie en présence d'IL-6 et de TGF- $\beta$  pour ensuite se stabiliser en présence d'IL-23 (Harrington, Hatton et al. 2005). Les Treg sont une sous-population de lymphocytes T avec une activité immunosuppressive (Honda, Miyachi et al. 2011). Ces lymphocytes T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expriment le facteur de transcription Foxp3, et deux types de Treg Foxp3<sup>+</sup> sont retrouvés: les nTreg (*naturally occurring*) et les iTreg (*inducible*) (Honda, Miyachi et al. 2011). Les nTreg se développent dans le thymus et jouent un rôle dans la tolérance et l'homéostasie, tandis que les iTreg sont différenciés à partir de lymphocytes T naïfs en présence de TGF- $\beta$  (Honda, Miyachi et al. 2011).

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> pourraient jouer un rôle dans la prévention de la dissémination de *C. neoformans* en contribuant à la formation dans les poumons de granulomes dans lesquels les levures sont enfermées dans des cellules macrophagiques géantes multi-nucléées (Hill 1992). Lors de l'infection pulmonaire à *C. neoformans*, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont recrutées par le CCL2 et ne sont activées qu'au site d'infection, mais avec une faible prolifération à ce site, tandis qu'aux organes lymphoïdes secondaires, il y a une très grande prolifération et une faible activation (Huffnagle, Strieter et al. 1995; Lindell, Moore et al. 2006). Une forte stimulation par les CD présentant des antigènes de *Cryptococcus* est requise pour l'activation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Bauman, Huffnagle et al. 2003). Chez l'homme, les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> ont la capacité de tuer *C. neoformans* par la sécrétion de granulysine et cette sécrétion est dépendante d'IL-2, STAT5 et PI3K (Zheng, Ma et al. 2007; Zheng, Jones et al. 2008; Xing, Wu et al. 2010). Il est important de noter que la granulysine n'existe pas chez la souris et qu'un homologue n'a pas encore été trouvé (Xing, Wu et al. 2010). Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> sont aussi



importants pour le recrutement des leucocytes lors de l'infection du SNC (Buchanan and Doyle 2000).

### Réponses Th1, Th2 et Th17

*Cryptococcus* peut induire une réponse cellulaire protectrice ou non-protectrice (Murphy, Schafer et al. 1998). La réponse Th1, caractérisée par la production des cytokines TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL-12, se manifeste par le recrutement des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, la formation de granulomes au site d'infection, contenant des macrophages activés de façon classique, l'élimination de *Cryptococcus* et la résolution de l'infection (Arora, Hernandez et al. 2005; Jain, Zhang et al. 2009). L'expression de CCR2 est primordiale afin de promouvoir la réponse protectrice Th1 contre *Cryptococcus* (Traynor, Herring et al. 2002). La sécrétion rapide de TNF- $\alpha$  par les macrophages activés par *C. neoformans* est essentielle pour la production d'IL-12 par les CPA, et d'IFN- $\gamma$  par les cellules T et les cellules NK, afin d'induire la réponse Th1 protectrice (Kawakami, Qureshi et al. 1999; Herring, Lee et al. 2002; Herring, Falkowski et al. 2005; Kleinschek, Muller et al. 2006). Des études chez l'humain ont démontré que la présence d'IFN- $\gamma$  et de TNF- $\alpha$  dans le système nerveux central est primordiale à la survie de l'individu atteint de méningite cryptococcique et infecté par le VIH-1 (Siddiqui, Brouwer et al. 2005). La chimiokine MIP-1 $\alpha$ , sécrétée par les lymphocytes T activés, les macrophages, les cellules de Langerhans, les neutrophiles, les monocytes, les cellules épithéliales et les fibroblastes, est essentielle pour le recrutement des macrophages et des neutrophiles au site d'infection par *Cryptococcus*, ainsi que l'inhibition de la migration des éosinophiles (Huffnagle, Strieter et al. 1997; Olszewski, Huffnagle et al. 2001). La délétion de MIP-1 $\alpha$  entraîne l'induction d'une réponse Th2 non-protectrice (Olszewski, Huffnagle et al. 2000).

L'IL-23, sécrétée par les macrophages et les cellules dendritiques, contribue au maintien de la polarisation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> vers une réponse Th17, caractérisée par la sécrétion d'IL-17, d'IL-6 et de TNF, et augmente la réponse

inflammatoire et l'élimination de *C. neoformans* dans les poumons (Langrish, Chen et al. 2005; Kleinschek, Muller et al. 2006; Kleinschek, Muller et al. 2010). Contrairement à l'IL-23, l'IL-13 semble down-réguler la réponse Th17 protectrice tout en augmentant la réponse Th2 non-protectrice (Muller, Stenzel et al. 2007). Les réponses Th1 et Th17 sont donc essentielles pour la protection contre *C. neoformans* dans les poumons puisqu'elles réduisent la prolifération intracellulaire des levures et l'expulsion par les macrophages, mais elles n'empêchent pas la dissémination (Voelz, Lammas et al. 2009; Zhang, Wang et al. 2009).

La réponse Th2 à l'égard de *C. neoformans* est induite par la production d'IL-4, d'IL-5 et d'IL-13 (Muller, Stenzel et al. 2007; Jain, Zhang et al. 2009). Dans les poumons, la sécrétion d'IL-10 par les monocytes aide à la polarisation vers la réponse Th2 (Hernandez, Arora et al. 2005). L'IL-13 participe à l'activation alternative des macrophages, un recrutement massif d'éosinophiles, une élévation de la production de mucus et l'hyper-réactivité des voies respiratoires (Muller, Stenzel et al. 2007). Lors d'une réponse non-protectrice Th2 avec la souche H99 de *C. neoformans var. grubii* (sérotypage A), les poumons sont visiblement altérés; il y a recrutement d'éosinophiles et dommages à l'épithélium, activation alternative des macrophages, et élévation d'IgE sérique (Jain, Zhang et al. 2009). Bien que la réponse Th2 contribue à l'augmentation de la prolifération intracellulaire de *C. neoformans*, elle réduit le niveau d'expulsion par les macrophages (Voelz, Lammas et al. 2009). Ces facteurs contribuent au déclenchement d'une infection chronique par *Cryptococcus*. La cytokine GM-CSF est produite par les cellules épithéliales, les macrophages, les fibroblastes et les cellules T activées (Chen, Olszewski et al. 2007). En général, elle active les macrophages et augmente leur activité antibactérienne et antifongique (Chen, Olszewski et al. 2007). Lors de l'infection par *C. neoformans*, GM-CSF induit une réponse non-protectrice Th2, mais sa délétion empêche l'induction d'une réponse protectrice puisqu'il n'y a plus de recrutement et de maturation des cellules dendritiques (Chen, Olszewski et al. 2007). Ceci signifie qu'il pourrait jouer un double rôle, surtout de non-protection, dans les poumons infectés par *C. neoformans* (Chen, Olszewski et al. 2007). Le TGF- $\beta$  semble aussi jouer un double rôle dans le sens qu'il prévient l'accumulation d'éosinophiles dans les poumons, mais empêche

l'élimination complète de *C. neoformans* en permettant la réplication des levures (Williams, Humphreys et al. 2005)

### Lymphocytes T CD8+

Les lymphocytes T CD8+ sont des cellules cytotoxiques spécifiques pour un antigène (Kindt, Goldsby et al. 2007). Pour être cytotoxique, le lymphocyte T doit être activé par une cellule présentatrice d'antigènes. Il peut ensuite proliférer et se différencier en cellule T effectrice (Kindt, Goldsby et al. 2007). Les lymphocytes T CD8+ tuent les pathogènes de deux façons : par des protéines cytotoxiques (perforine et granzyme) ou en induisant la mort de la cellule liée par interaction avec Fas/FasL (Kindt, Goldsby et al. 2007).

Les lymphocytes T CD8+, tout comme les T CD4+, sont importants pour l'induction de la réponse DTH (*delayed-type hypersensitivity*) à l'égard de *C. neoformans* dans les poumons (Mody, Paine et al. 1994). Il a été démontré chez la souris que l'activation, l'expansion et l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+ s'effectuent indépendamment des lymphocytes T CD4+ (Lindell, Moore et al. 2005). Chez la souris, les lymphocytes T CD8+, attirés par le CCL2 sécrété par les cellules épithéliales et les macrophages, reconnaissent les macrophages infectés par *C. neoformans* et produisent de l'IFN- $\gamma$ , ce qui réduit la croissance intracellulaire des levures (Traynor, Kuziel et al. 2000; Lindell, Moore et al. 2005). Chez l'homme, les lymphocytes T cytotoxiques tuent *Cryptococcus* grâce à la sécrétion de granulysine (Ma, Spurrell et al. 2002). La granulysine interagit avec les lipides de la membrane cellulaire de la levure en activant les enzymes responsables de la dégradation lipidique (Ma, Spurrell et al. 2002). La sécrétion des granulysines par les lymphocytes T CD8+ dépend de la reconnaissance d'antigènes de *Cryptococcus* par les lymphocytes T CD4+, ce qui active les cellules accessoires comme les macrophages et les monocytes (Ma, Spurrell et al. 2002). En effet, ces cellules sécrètent de l'IL-15 qui up-régule la production de granulysine chez les lymphocytes T CD8+ (Ma, Spurrell et al. 2002). La signalisation JAK/STAT est essentielle pour

l'expression de granulysine en réponse à l'IL-15 et l'IL-21 (Oykhman and Mody 2010).

### Lymphocytes $\gamma\delta$

Les lymphocytes  $\gamma\delta$  sont impliqués dans la réponse innée à l'égard de *C. neoformans* (Uezu, Kawakami et al. 2004). Elles constituent moins de 5% des cellules immunitaires totales et se retrouvent dans plusieurs organes contenant des tissus épithéliaux tels la peau, les poumons, les intestins, le tractus génital et urinaire (Nanno, Shiohara et al. 2007). Leur rôle principal lors d'une infection est d'empêcher une réponse inflammatoire Th1 excessive (Nanno, Shiohara et al. 2007). Lors de l'infection par *C. neoformans*, il y a accumulation des cellules  $\gamma\delta$  au site d'infection et production de cytokines de type Th2 ainsi que du TGF- $\beta$  (Kawakami 2004; Uezu, Kawakami et al. 2004).

### Lymphocytes B

Les lymphocytes B naïfs sont générés dans la moelle osseuse (Kindt, Goldsby et al. 2007). Ils circulent dans le sang et migrent vers la rate et les ganglions lymphatiques (Kindt, Goldsby et al. 2007). Il y a activation lorsqu'ils interagissent avec un antigène présenté par une cellule T, ce qui induit leur prolifération et différenciation en plasmocytes ou en lymphocytes B mémoires (Kindt, Goldsby et al. 2007).

Le rôle protecteur des lymphocytes B contre *Cryptococcus* est généralement moindre que celui des lymphocytes T. La capsule de *C. neoformans* stimule les lymphocytes B, mais ils ne produisent pas plus d'anticorps en réponse à cette stimulation (Rodrigues, Heise et al. 2005). Lorsque la production de lymphocytes T est déficiente, les lymphocytes B semblent jouer un rôle important dans la défense contre *Cryptococcus* dans le cerveau (Aguirre and Johnson 1997). Chez l'homme, les lymphocytes B mémoire IgM<sup>+</sup> sont essentiels pour l'immunité contre les pathogènes encapsulés puisqu'ils sécrètent du TNF- $\alpha$ , de l'IFN- $\gamma$  et de l'IL-12 (Subramaniam,

Metzger et al. 2009). Contrairement à l'homme, il a été démontré que l'absence d'IgM chez la souris contribue à une survie prolongée (Subramaniam, Datta et al. 2010). L'homologue chez la souris de la cellule B mémoire IgM<sup>+</sup> est la cellule B B-1a (Subramaniam, Datta et al. 2010). Elle se retrouve surtout dans le péritoine et la rate et possède la capacité de tuer *Cryptococcus*, mais uniquement à de faibles inoculums (Subramaniam, Datta et al. 2010).

Les anticorps sécrétés par les lymphocytes B semblent jouer un rôle dans la protection contre l'infection au *Cryptococcus*, mais leur efficacité varie beaucoup et dépend de la quantité, la spécificité, de l'isotype ainsi que de la souche de *Cryptococcus* (Casadevall 1995). Les anticorps peuvent se lier à la capsule, aux protéines, aux mannoprotéines et au glucosylcéramide de *Cryptococcus* (Casadevall and Pirofski 2005). L'une de leurs fonctions serait de down-réguler la réponse inflammatoire en réduisant les dommages à l'hôte (Feldmesser, Mednick et al. 2002). L'un des premiers rôles qu'il est possible d'attribuer est que la liaison des anticorps sur les biofilms de *Cryptococcus*, lors de l'expulsion par les macrophages, semble contribuer à la réduction de la dispersion des levures (Alvarez, Saylor et al. 2008; Robertson and Casadevall 2009). L'efficacité des anticorps est dépendante de la production de NO, ce qui augmente la survie chez les souris (Rivera, Mukherjee et al. 2002). Les anticorps peuvent aussi augmenter la production de NO (Casadevall 1995). Chez la souris, l'IgG1 serait la plus efficace contre *C. neoformans* par la réduction des dommages à l'hôte, mais sans réduire la charge fongique (Rivera, Zaragoza et al. 2005). Il a été démontré que l'IgG1 se lie à la paroi cellulaire et produit des changements dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines, et accroît la susceptibilité à l'amphotéricine B (McClelland, Nicola et al. 2010). Par contre, les IgG humains IgG2 et IgG4 seraient les plus efficaces pour prolonger la survie de l'hôte (Beenhouwer, Yoo et al. 2007). Les anticorps jouent aussi un rôle d'opsonine, puisque les macrophages ne phagocytent seulement qu'en présence d'anticorps ou de complément (Macura, Zhang et al. 2007). Il y a donc augmentation de la présentation d'antigènes par les macrophages. Les anticorps entraînent aussi une augmentation de l'activité antifongique chez les cellules NK et les macrophages (Casadevall 1995). Ils se lient au GXM libre circulant, empêchant ce dernier d'inhiber la migration des

leucocytes (Casadevall 1995). Par contre, l'affinité des IgM et IgG3, moins efficaces et non-protecteurs respectivement, est plus élevée pour le GXM qu'IgG1, rendant ce mécanisme de protection moins efficace contre *Cryptococcus* puisque la phagocytose des levures est réduite (Casadevall 1995; Taborda and Casadevall 2002).

La liaison des anticorps à la capsule de *C. neoformans* induit un changement morphologique. Dépendamment de l'épitope reconnu par l'anticorps et du sérotype de la levure, la capsule devient dentelée (*rim*) (tous les sérotypes) ou rebondie (*puffy*) (sérotypes A et D) (Duro, Netski et al. 2003). Les capsules dentelées sont en général mieux opsonisées (Netski and Kozel 2002). Une trop grande quantité d'anticorps non-protecteurs liés peut par contre conduire à une paralysie immunologique, éliminant ainsi l'effet positif des anticorps contre *Cryptococcus* (Schop 2007).

### Système du complément

Le système du complément est un effecteur de la réponse innée qui peut aussi jouer un rôle dans la réponse adaptative (Kindt, Goldsby et al. 2007). Le système du complément a plusieurs fonctions : lyse de bactéries et virus, opsonisation pour augmenter la phagocytose, liaison avec des récepteurs du complément pour induire l'inflammation et la sécrétion de molécules et enfin, aide à retirer les complexes immuns de la circulation (Kindt, Goldsby et al. 2007).

Comme mentionné plus haut, la capsule active de façon alternative le système du complément. La mélanine peut activer la voie alternative du système du complément par la liaison du C3 (Rosas, MacGill et al. 2002).

### Cellules microgliales

Dans le cerveau, les cellules microgliales et les astrocytes jouent un rôle dans la défense contre *Cryptococcus*. L'addition d'anticorps contre le GXM de la capsule induit la phagocytose des levures par les cellules microgliales (Lee, Kress et al. 1995).

Les cellules microgliales humaines sont aussi capables de phagocyter *Cryptococcus* par le récepteur FC $\gamma$ R III, et produisent MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES, CCL2 et CXCL8, ce qui contribue au recrutement des cellules immunitaires effectrices contre *Cryptococcus* (Goldman, Song et al. 2001; Song, Shapiro et al. 2002). De plus, avec les astrocytes, elles produisent du NO qui inhibe la croissance de *Cryptococcus* dans le cerveau (Lee, Dickson et al. 1994; Zhou, Gault et al. 2007). Chez la souris, les souches avirulentes phagocytées par les cellules microgliales induisent la production d'IL-12, de TNF- $\alpha$ , d'IL-1 $\beta$  et d'IFN- $\gamma$  (Barluzzi, Brozzetti et al. 2000).

Les cellules microgliales doivent être activées par IFN- $\gamma$ , produit lors d'une infection, pour pouvoir phagocyter *Cryptococcus*. Il y a alors up-régulation du CMH II, du CD40, CD80 et CD84 à la surface des cellules microgliales (Aguirre and Miller 2002; Zhou, Gault et al. 2007). La chimiokine CCR5, co-récepteur pour le virus du SIDA (gp120) qui est exprimée sur les cellules T, les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules microgliales, est nécessaire pour le recrutement efficace des leucocytes et la protection du cerveau contre *C. neoformans*, mais pas dans les poumons (Huffnagle, McNeil et al. 1999). Chez l'humain, l'action de différentes cytokines sur les cellules microgliales ne semble pas jouer un rôle dans l'augmentation de l'activité fongistatique des cellules du cerveau (Lipovsky, Juliana et al. 1998). Les survivants séropositifs à l'infection au *C. neoformans* du SNC ont de plus grandes concentrations de TNF- $\alpha$ , d'IFN- $\gamma$ , d'IL-6 et de CXCL8 dans le LCR (Siddiqui, Brouwer et al. 2005). Or, chez les patients séronégatifs infectés au *C. gattii*, la concentration de ces cytokines dans le LCR est beaucoup plus faible, indiquant une réponse immunitaire atténuée au *C. gattii* (Brouwer, Siddiqui et al. 2007).

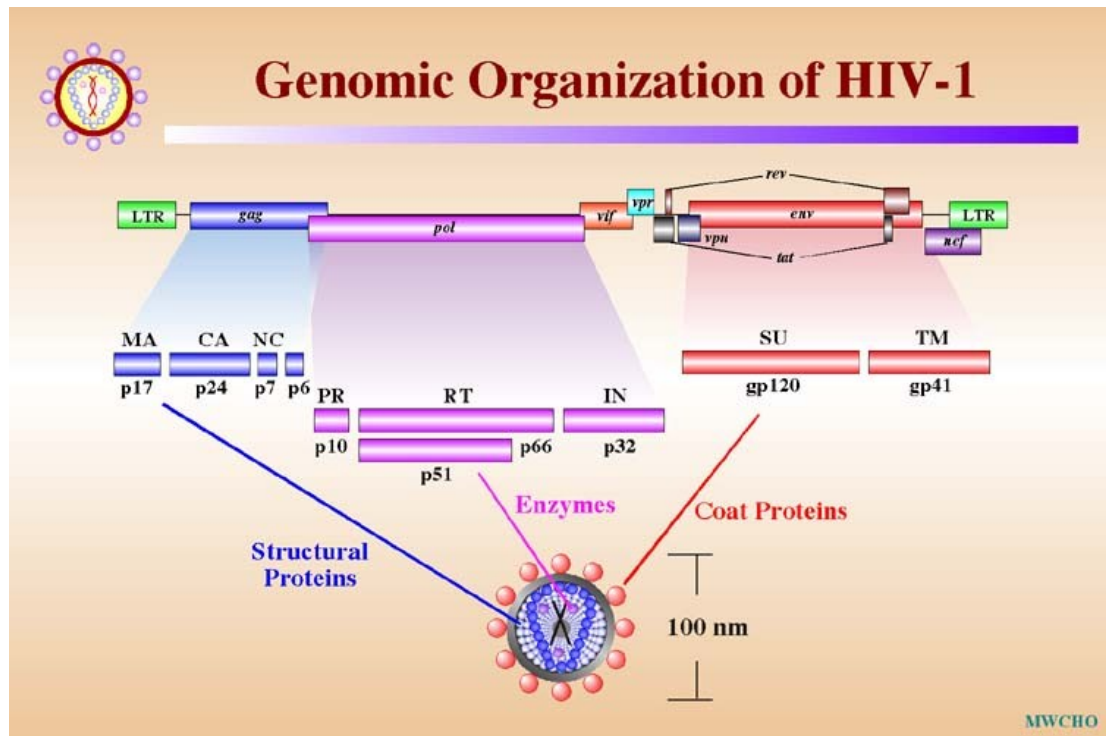
## CHAPITRE 2 : LA CRYPTOCOCCOSE DANS LE CONTEXTE DU VIH

La pandémie des temps modernes est celle du SIDA. La maladie a été découverte en 1981 et depuis, les cas d'infection ont crû jusqu'à atteindre une estimation de 40.3 millions de personnes infectées globalement, dont 2.3 millions d'enfants de moins de 15 ans (Kindt, Goldsby et al. 2007). Plus de la moitié des personnes infectées mondialement habitent en Afrique subsaharienne (Kindt, Goldsby et al. 2007). Le mode de transmission le plus commun est par voie sexuelle (>80%) (Cohen, Shaw et al. 2011). Le VIH-1 peut aussi être transmis par voie sanguine lors d'utilisation de drogues injectables, et de la mère à l'enfant dans les dernières semaines de la grossesse, au moment de l'accouchement, et de l'allaitement (Kindt, Goldsby et al. 2007).

### Le virus d'immunodéficience humaine 1 (VIH-1)

Le VIH-1 est un lentivirus de la famille des rétrovirus qui transporte son bagage génétique sous forme d'ARN (Kindt, Goldsby et al. 2007). Le virus possède plusieurs clades dont le clade B est responsable de la majorité des infections en Amérique et en Europe, tandis que l'infection en Inde est principalement due à l'infection par les virus du clade C (Forsman and Weiss 2008). Le VIH-1 est composé de neuf gènes (Figure 4). Les trois gènes majeurs *gag*, *pol* et *env* encodent des précurseurs de polyprotéines qui seront clivées pour produire des protéines de la capsid, de l'enveloppe et des enzymes requis pour la réplication (Kindt, Goldsby et al. 2007). Les gènes *tat*, *rev* et *nef* encodent des protéines régulatrices qui contrôlent l'expression du VIH-1, tandis que les gènes *vif* et *vpu* encodent les protéines requises pour la maturation des virions et *vpr* encode un activateur de transcription (Kindt, Goldsby et al. 2007).





**Figure 4. Organisation du génome du VIH-1.** Le VIH-1 est composé de 9 gènes, dont 3 majeurs. Le gène *gag* encode les protéines structurales du virus, le gène *pol* encode les enzymes, et le gène *env* encode les protéines de l'enveloppe. Les gènes *tat*, *rev* et *nef* encodent des protéines régulatrices, tandis que les gènes *vif* et *vpu* encodent les protéines requises pour la maturation des virions. Enfin, *vpr* encode un activateur de transcription. (Gong and Ishmael 2005, <http://www.stanford.edu/group/virus/retro/2005gongishmail/HIV.html>)

*Gag* encode un précurseur qui produit plusieurs protéines de la nucléocapside : p17 qui forme la couche extérieure du cœur de la capsid, p24 qui forme la couche intérieure, p9 qui est un composant du cœur nucléaire et p7 qui se lie directement à l'ARN génomique (Kindt, Goldsby et al. 2007).

*Env* encode un précurseur pour gp41, protéine transmembranaire qui s'associe à gp120, autre produit d'*env*, qui est situé sur gp41 à l'extérieur de l'enveloppe (Kindt, Goldsby et al. 2007).

*Pol* encode des précurseurs pour les enzymes p64, activité de reverse transcriptase et de RNase, p51 qui a aussi une activité de reverse transcriptase, p10 qui est une

protéase qui clive le précurseur de *gag* et enfin l'intégrase p32 (Kindt, Goldsby et al. 2007).

*Tat* encode p14 qui active la transcription d'ADN proviral (Kindt, Goldsby et al. 2007). *Rev* encode p19 qui exporte les mARNs hors du noyau (Kindt, Goldsby et al. 2007). *Nef* encode p27 qui down-régule l'expression du CMH I et II et CD4 de la cellule infectée (Kindt, Goldsby et al. 2007).

*Vpu* encode la protéine p16 qui est requise pour le bon assemblage viral, le bougeonnement, la dégradation du CD4 dans le réticulum endoplasmique et la libération des particules virales (Kindt, Goldsby et al. 2007). *Vif* encode p23 qui joue un rôle dans la maturation et l'infectiosité des particules virales (Kindt, Goldsby et al. 2007). Enfin, *vpr* encode la protéine p15 qui inhibe la division cellulaire et favorise la relocalisation nucléaire du complexe de pré-intégration du virus (Kindt, Goldsby et al. 2007).

### Réplication du VIH-1

Afin d'accomplir son cycle de réplication, le virus doit tout d'abord s'attacher à une cellule cible. Le VIH-1 possède un tropisme pour les corécepteurs CXCR4 sur les lymphocytes T CD4 et CCR5 sur les macrophages et cellules dendritiques (Kindt, Goldsby et al. 2007). En plus des corécepteurs, le gp120 du VIH-1 doit se lier au CD4 de la cellule à infecter (Kindt, Goldsby et al. 2007). Il y a alors fusion du virus avec la cellule cible grâce à la protéine gp41 du VIH-1, et la nucléocapside contenant le génome viral ainsi que les enzymes nécessaires à la réplication entre dans le cytoplasme de la cellule cible (Kindt, Goldsby et al. 2007). Le génome viral et les enzymes sont libérés suite à la dissolution de la capside. La reverse transcriptase peut opérer sur les ssARN et former des hybrides ARN-ADN (Kindt, Goldsby et al. 2007). Il y a ensuite synthèse du deuxième brin d'ADN. L'ADN viral est par la suite transféré et intégré par l'intégrase p32 dans l'ADN chromosomique de la cellule cible (Kindt, Goldsby et al. 2007). Il y a donc formation d'un provirus.

Le provirus peut maintenant servir à stimuler la transcription d'ARN messagers viraux (Kindt, Goldsby et al. 2007). Cet ARN viral est exporté dans le cytoplasme de la cellule hôte et ses ribosomes catalysent la synthèse des précurseurs viraux (Kindt, Goldsby et al. 2007). La protéase clive les précurseurs en protéines virales et la nucléocapside se forme par bourgeonnement de la cellule hôte au même moment que les protéines gp41 et gp120 sont insérées dans la membrane (Kindt, Goldsby et al. 2007). Il y a maturation du virion et le cycle d'infection peut recommencer (Kindt, Goldsby et al. 2007).

### Les stades de l'infection au VIH-1

Il y a trois stades d'infection associés au VIH-1 : la phase aiguë, la phase chronique et la phase SIDA. Ces stades s'étendent sur 9 à 12 ans, mais il y a des exceptions; certains patients atteignent le dernier stade en 2 ans, alors que d'autres n'atteignent jamais ou prennent plus de 15 ans avant d'atteindre le dernier stade d'infection (Forsman and Weiss 2008).

La phase aiguë est caractérisée par une virémie extrême (Forsman and Weiss 2008). Il n'y a généralement pas de manifestations cliniques. C'est à ce moment que le virus est présenté aux lymphocytes T et qu'il y a, après quelques jours, une diminution des particules virales par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> cytotoxiques ainsi que le début d'une diminution des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. (Forsman and Weiss 2008). Il y a séroconversion qui conduit au prochain stade d'infection.

La phase chronique est caractérisée au départ par une réduction de la charge virale. Plus la charge virale dans le sang au départ de la phase chronique est élevée, plus rapidement le patient atteindra la phase SIDA (Forsman and Weiss 2008). Les progressions lentes prendront jusqu'à 15 ans pour atteindre la phase SIDA, tandis que les progressions rapides prendront moins de 5 ans (Forsman and Weiss 2008). Durant la phase chronique, il y a destruction progressive des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et réplication continue des particules virales (Forsman and Weiss 2008). Lorsque le

nombre de lymphocytes T CD4+ atteint moins de 200 cellules/mm<sup>3</sup>, la dernière phase d'infection est amorcée (Forsman and Weiss 2008).

Le stade SIDA est représenté par la détection d'ARN viral dans le sang, une très forte diminution du nombre de lymphocytes T CD4+ (< 200 cellules/mm<sup>3</sup>), une absence ou une très faible réponse DTH et l'infection par des pathogènes opportunistes, par exemple la candidose et la cryptococcose (Forsman and Weiss 2008). En général, en l'absence de traitements antirétroviraux, les patients sidéens meurent des infections opportunistes et non du SIDA lui-même.

#### Perturbations du système immunitaire par VIH-1

Les perturbations du système immunitaire par le VIH-1 sont nombreuses. On retrouve tout d'abord une déplétion profonde des lymphocytes T CD4+, une diminution de la capacité des cellules dendritiques à capturer et présenter les antigènes, l'absence de prolifération des cellules B spécifiques au VIH-1, la présence d'une réponse Th2, l'élimination de la réponse DTH et une réduction des lymphocytes T cytotoxiques (Kindt, Goldsby et al. 2007).

Il y a une dérégulation de la production de cytokines par les neutrophiles chez les patients infectés au VIH-1 (Vecchiarelli, Monari et al. 2000). Les macrophages alvéolaires démontrent une plus faible activité fongicide à l'égard de *C. neoformans* chez les patients infectés au VIH (Jeong, Reardon et al. 2000). De plus, leur migration par chimiotactisme ainsi que leur présentation antigénique par le CMH sont défectueuses (Polyak, Chen et al. 1997; de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). Les lymphocytes T humains dépendent de la voie JAK/STAT pour la sécrétion de granulysine (Hogg, Bowick et al. 2009). Cependant, VIH-1 interfère avec cette cascade ce qui entraîne une perte de la production efficace de granulysine chez les lymphocytes T CD8+ (Hogg, Bowick et al. 2009). Bien que le VIH-1 n'interfère pas avec les récepteurs FcγR des neutrophiles, il entraîne un défaut dans l'expression de CD88 (récepteur du C5a), ce qui cause une réduction de la production de CXCL8 par les PMNs (Monari, Casadevall et al. 1999). Par contre, le nombre de

neutrophiles ainsi que leur activité antifongique sont intacts chez les souris transgéniques exprimant le génome du VIH-1 (Marquis, Lewandowski et al. 2006). Les cellules dendritiques sont fortement déplétées et présentent un défaut de maturation, se traduisant par l'expression réduite du CMH I et II et des molécules co-stimulatrices (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). De plus, les patients sidéens semblent aussi avoir de la difficulté à induire et à maintenir une réponse humorale contre les mannoprotéines de *C. neoformans* (Pitzurra, Perito et al. 2003).

Au niveau de l'activité des protéines du virus, tat induit le recrutement et l'adhésion des monocytes au VIH, augmentant l'infection (Pugliese, Vidotto et al. 2005). Elle aide aussi à l'activation des cellules microgliales qui produisent plus de cytokines inflammatoires, ce qui augmente le recrutement des monocytes dans le cerveau et donc une invasion du cerveau par VIH-1 (Pugliese, Vidotto et al. 2005). La gp120 prévient la fusion phagosome-lysosome dans les phagocytes, down-régule la production d'IL-12 et inhibe la poussée oxydative des macrophages (Harrison and Levitz 1997; Pugliese, Vidotto et al. 2005). Elle peut aussi entraîner une activation défectueuse des lymphocytes T par liaison au CD4, induisant un état d'anergie (Zheng, Jones et al. 2008). Le CCR5 est requis pour le recrutement des leucocytes vers le cerveau et sa liaison avec gp120 inhibe ce recrutement (Harrison 2000). Nef inhibe la phagocytose ainsi que le chimiotactisme des macrophages (Pugliese, Vidotto et al. 2005). Il empêche aussi la fusion du VIH avec les corps apoptotiques dans les neutrophiles (Pugliese, Vidotto et al. 2005). Il interfère avec les cascades de signalisation intracellulaire en activant les voies du calcium, du TCR ainsi que de AP-1 (Percario, Olivetta et al. 2003). Il induit un stade d'activation chronique des macrophages, provoquant une activation de NF- $\kappa$ B, STAT1 et une augmentation de la production de MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , IL-6, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$ , ce qui augmente indirectement la réplication du virus (Olivetta, Percario et al. 2003). Nef active aussi STAT3 par la production de MIP-1 $\alpha$  et MIP-1 $\beta$ , activant ainsi davantage les macrophages (Percario, Olivetta et al. 2003).

### La cryptococcose chez l'individu atteint du VIH-1

En différentes régions du monde, l'incidence des méningites à *Cryptococcus* chez les patients atteints du VIH-1 varie de 0.04% à 12% (Park, Wannemuehler et al. 2009). Le plus grand bassin d'infection se trouve en Afrique subsaharienne (environ 720 000/année), alors que les infections en Europe de l'Ouest et centrale, ainsi qu'en Océanie sont beaucoup plus rares (Park, Wannemuehler et al. 2009). Mondialement, il y a environ 1 million de cas d'infection par année dont environ 625 000 décès survenant dans les trois premiers mois après l'infection (Park, Wannemuehler et al. 2009).

Il y a plusieurs différences cliniques entre la cryptococcose chez l'individu immunocompétent et l'individu immunodéprimé. Tout d'abord, la durée des signes et symptômes avant le diagnostic de méningite à cryptococque est souvent plus courte chez les sidéens et ils présentent souvent un deuxième site d'infection, par exemple la peau (Mitchell and Perfect 1995). Presque toutes les souches isolées chez les patients sidéens sont du sérotype A, tandis qu'environ 75% des isolats chez les individus séronégatifs appartiennent à ce sérotype (Mitchell and Perfect 1995). Sur les radiographies pulmonaires, la cryptococcose se caractérise par la présence d'infiltrats interstitiels diffus, contrairement à des nodules définis chez les patients immunocompétents (Mitchell and Perfect 1995). La détection d'antigènes représente le moyen le plus sensible (>97%) pour détecter la présence de *Cryptococcus* chez les patients infectés au VIH-1, suivie de près par la culture du LCR (81%) et les hémocultures (44%) (Manfredi, Calza et al. 2003; Waters and Nelson 2005). On retrouve d'ailleurs chez les sidéens une plus grande charge fongique et une absence ou très faible réponse inflammatoire dans les tissus infectés par *Cryptococcus* (Severo, Gazzoni et al. 2009).

L'observation des poumons de patients atteints du SIDA et infectés au *C. neoformans* démontre trois types histopathologiques : prolifération intra-alvéolaire de *Cryptococcus* et réponse histiocytique sans altérations des poumons; prolifération focale intra- et extra-alvéolaire avec réponse histiocytique importante et présence de cellules géantes multi-nucléées; et prolifération massive, avec réponse histiocytique,

de cellules géantes multi-nucléées, et hémorragie (Shibuya, Hirata et al. 2005). Il y a généralement absence de granulomes, mais si le patient est déjà traité au HAART, les radiographies peuvent montrer la présence de granulomes dans les poumons (Shibuya, Hirata et al. 2005).

L'infection du système nerveux central par *Cryptococcus* est plus fréquente chez les patients atteints du SIDA, tandis que l'infection limitée aux poumons est plus courante chez les patients sans immunodéficience (Jongwutiwes, Sungkanuparph et al. 2008; Davis, Horn et al. 2009). À noter que les lésions de la peau causées par *Cryptococcus*, qui sont beaucoup plus communes chez les sidéens, indiquent souvent un état de dissémination (Manfredi, Calza et al. 2003; Waters and Nelson 2005). Les rechutes sont aussi plus courantes chez les patients atteints du VIH-1, mais le taux de mortalité ne diffère pas beaucoup et est assez élevé chez les deux types de patients (Davis, Horn et al. 2009).

Chez les patients atteints du SIDA, il a été démontré que les hommes sont plus souvent affectés de méningite à cryptocoque que les femmes (Lee, Wang et al. 2011). Les concentrations plasmatiques de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 sont plus élevées chez les sidéens avec fongémie à *C. neoformans* (Lortholary, Improvisi et al. 1999; Lortholary, Sitbon et al. 2005). La sécrétion de granulysine par les lymphocytes T CD4+ chez les sidéens est déficiente, ce qui réduit leur activité contre *Cryptococcus* (Zheng, Ma et al. 2007).

Le VIH-1 et *Cryptococcus* peuvent aussi mutuellement augmenter leur virulence (Lortholary, Sitbon et al. 2005). *C. neoformans* augmente la réplication du VIH-1 dans les monocytes (Lortholary, Sitbon et al. 2005). En effet, *C. neoformans* induit la production de TNF- $\alpha$  par les monocytes, et cette cytokine augmente la production de VIH-1 (Harrison, Nong et al. 1997). La sécrétion de MIP-1 $\beta$  par les cellules microgliales inhibe le rétrovirus (Goldman, Song et al. 2001). Par contre, *C. neoformans* inhibe la production de MIP-1 $\beta$  par ces cellules (Goldman, Song et al. 2001). Le défaut d'expression de CD88 chez les neutrophiles de patients sidéens, qui entraîne une inhibition de production de CXCL8, provoque une réduction de l'activation du système du complément et la migration des neutrophiles vers le site

infecté par *C. neoformans* (Lortholary, Sitbon et al. 2005). Il y a aussi chez ces patients activation chronique des neutrophiles et production élevée d'IL-12 (Vecchiarelli, Monari et al. 2000; Pitzurra, Perito et al. 2003). Par contre, lorsque ces cellules infectées par le rétrovirus sont aussi mises en présence de *C. neoformans*, il y a inhibition de la production d'IL-12 par le gp120 viral, ainsi que de l'expression du récepteur de l'IL-12 sur les lymphocytes T (Pietrella, Kozel et al. 2001). La gp120 du VIH-1 aide aussi *C. neoformans* à provoquer une réponse Th2 en exacerbant la capacité de la levure à induire la production d'IL-10 par les monocytes et en inhibant la translocation du CD40 à la surface des cellules (Pietrella, Kozel et al. 2001; Lortholary, Sitbon et al. 2005). La réponse Th1 protectrice est donc inhibée. Il augmente aussi l'expression du CMH II et des molécules co-stimulatrices B7-2 par sa liaison au CD4 et augmente donc la production d'IL-4 et inhibe l'IFN- $\gamma$ , ce qui réduit encore la réponse protectrice Th1 (Pietrella, Monari et al. 1999). La gp41 exerce son activité directement sur les cellules épithéliales en augmentant l'adhésion de *C. neoformans* (Jong, Wu et al. 2007).

Il y a présence d'hypergammaglobulinémie dans le sang des patients sidéens, ce qui pourrait conduire à une anergie (Pitzurra, Perito et al. 2003). De plus, les patients sidéens chez qui le pourcentage de lymphocytes B exprimant l'IgM est diminué sont à plus haut risque d'infection cryptococcique (Subramaniam, Metzger et al. 2009).

#### Traitements de première intention

Depuis le début du traitement HAART, l'incidence des infections au *Cryptococcus* est de 0.1%-1% (Davis, Horn et al. 2009). Par contre, la mortalité, qui survient environ 6 mois après l'infection du SNC, atteint néanmoins un taux de 20% (Davis, Horn et al. 2009). Un pronostic favorable exige le diagnostic précoce de l'infection, une thérapie initiale efficace et un contrôle de la pression inter-crânienne (Davis, Horn et al. 2009).

Lorsqu'une méningo-encéphalite par *Cryptococcus* est diagnostiquée chez un patient, un traitement initial combiné d'amphotéricine B (0.7-1mg/kg/jour) et de flucytosine



(100mg/kg/jour) doit être donné pendant deux semaines, suivi d'un traitement de consolidation au fluconazole (Davis, Horn et al. 2009; Ritter and Goldman 2009).

Pour les infections pulmonaires légères ou modérées, une monothérapie au fluconazole (400mg/jour) pendant six à douze mois est de mise (Davis, Horn et al. 2009; Ritter and Goldman 2009). Si le traitement n'est pas toléré, il est aussi possible de traiter le patient à l'itraconazole (200-400mg/jour) pour la même durée (Ritter and Goldman 2009). Une ponction lombaire doit être effectuée pour détecter une possible dissémination. Il est important de noter que si l'infection pulmonaire est sévère ou qu'il y a détection d'antigènes dans le SNC, le traitement donné sera celui utilisé pour les méningo-encéphalites (Ritter and Goldman 2009).

Pour les autres types d'infections, le traitement associé aux méningo-encéphalites est généralement donné (Ritter and Goldman 2009). Il faut noter que pour tous les traitements donnés, une approche individuelle basée sur les signes et symptômes et résultats de laboratoire doit être utilisée, puisque les traitements généraux et standardisés ne sont pas efficaces pour tous (Ritter and Goldman 2009).

Le traitement de consolidation chez les sidéens est indéfini et le traitement initial correspond à celui pour le SNC (Mitchell and Perfect 1995). Bien que la thérapie combinée soit la plus efficace contre *Cryptococcus* chez les patients sidéens, l'amphotéricine B n'est pas disponible ou est très rare en Afrique subsaharienne (Jarvis, Dromer et al. 2008; Jackson and Hosseinipour 2010). Les patients sont donc généralement traités en monothérapie à l'aide de fluconazole, ce qui peut entraîner l'apparition de résistances (Jackson and Hosseinipour 2010).

### Résistance aux antifongiques

Des cas de résistance de *Cryptococcus* aux antifongiques ont été démontrés. Les pompes à efflux AFR1 chez *C. neoformans* lui confèrent une certaine résistance aux azolés (Morschhauser 2010). Sa capacité à former des bio-films offre une résistance à l'amphotéricine B ainsi qu'aux triazolés (Cowen and Steinbach 2008). La

calcineurine joue un rôle dans la résistance aux échinocandines (Cowen and Steinbach 2008). *C. neoformans* (sérotypes A et D) s'adapte aux concentrations élevées de fluconazole en dupliquant ses chromosomes sur lesquels sont situés ERG11 (cible du fluconazole) (Sionov, Lee et al. 2010).

### Traitements de seconde intention

Des traitements alternatifs doivent être considérés dans les cas où les patients ne répondent pas aux antifongiques donnés en première intention. La dexaméthasone est un glucocorticoïde pouvant être bénéfique chez les patients infectés au *C. gattii* qui ne répondent pas au traitement d'amphotéricine B / flucytosine, mais n'est pas un traitement alternatif pour contrôler la pression intra-crânienne (Phillips, Chapman et al. 2009). Mis à part le fluconazole, les autres azolés, comme le posaconazole, le voriconazole et l'itraconazole sont aussi efficaces contre *Cryptococcus*, mais leur plus grande hydrophobicité réduit leur pénétration dans le SNC (Gomez-Lopez, Zaragoza et al. 2008). Un traitement combiné de GM-CSF et de fluconazole augmente la capacité antifongique des monocytes chez des patients sidéens (Tascini, Vecchiarelli et al. 1999). La radio-immuno-thérapie est beaucoup plus efficace que l'amphotéricine B puisqu'elle réduit quasi complètement les charges de *Cryptococcus* autant dans le cerveau que dans les poumons (Bryan, Jiang et al. 2010). Des traitements d'immuno-modulation, qui renforcent les signaux de stimulation (CD40) ou d'inhibition (CTLA-4) des cellules, sont aussi à l'étude (Zhou and Murphy 2006). La promotion de la reconnaissance et de la signalisation de TLR9 par des agonistes synthétiques augmente la défense de l'hôte contre *C. neoformans* (Edwards, Williams et al. 2005).

Il sera peut-être aussi possible d'offrir à l'avenir des traitements de cytokines, associés aux antifongiques. L'administration d'IFN- $\gamma$  est très efficace, mais entraîne de sérieux effets secondaires et de la toxicité (Zhou and Murphy 2006). Des traitements avec des anticorps contre CD40, et à l'aide d'IL-2, ont le potentiel d'augmenter la résistance de l'hôte à la dissémination (Zhou, Gault et al. 2006). Un

traitement à l'IL-12 réduit la capacité de la gp120 à limiter la présence d'une réponse protectrice Th1 (Pietrella, Kozel et al. 2001). Il a aussi été démontré que l'administration d'IL-12 en combinaison avec le fluconazole produit un effet additif qui réduit grandement la charge de *Cryptococcus* (Zhou and Murphy 2006). Le traitement à l'aide d'IL-18 cause une augmentation de la survie dans un modèle murin de la cryptococcose (Zhou and Murphy 2006). Malheureusement, bien que ces traitements soient efficaces, ils entraînent souvent de sérieuses toxicités (Kawakami 2003; Zhou and Murphy 2006).

### Anticorps monoclonaux

En 1997, Aguirre et ses collègues ont démontré que l'exposition de très jeunes souris à *C. neoformans* les immunise contre la levure une fois adultes (Aguirre, Garvy et al. 1997). Il serait donc possible de vacciner contre *Cryptococcus* puisqu'une immunisation est possible. Beaucoup de recherches sur les anticorps monoclonaux ont été effectuées. La prémisse de la thérapie aux anticorps monoclonaux est de fournir des opsonines fonctionnelles pour augmenter les mécanismes de défense de l'hôte ainsi que l'efficacité des antifongiques (Lendvai and Casadevall 1999).

Il a été démontré que les bio-films de *C. neoformans* sont susceptibles aux anticorps monoclonaux qui agissent comme des cibles pour des traitements de radiation qui causent la mort des levures (Espinel-Ingroff 2009). De plus, l'immunisation passive d'anticorps monoclonaux contre la mélanine augmente le temps de survie et réduit la charge fongique dans un modèle murin d'infection au *C. neoformans* (Rosas, Nosanchuk et al. 2001). Il n'est malheureusement pas possible d'utiliser le GalXM, deuxième composant de la capsule, puisque les anticorps produits contre GalXM ne sont pas de bonnes opsonines (Chow and Casadevall 2011). La capsule empêche la reconnaissance des molécules C3 du complément liées sur les levures puisqu'elle englobe ces derniers. Lorsque des anticorps monoclonaux sont présents, ils se lient à la capsule et permettent la liaison de C3 au pourtour de la capsule, permettant ainsi la reconnaissance par les macrophages à partir de C3-CR3 et une activation classique

du système du complément (Zaragoza and Casadevall 2006). Ils peuvent aussi activer les macrophages par liaison croisée avec FcR lorsqu'ils sont liés à des levures (Casadevall, Feldmesser et al. 2002).

Un vaccin GXM-toxoïde tétanos administré chez des souris a été démontré comme efficace dans la production d'anticorps protecteurs (Devi 1996; Pirofski 2001; Zhou and Murphy 2006). Le vaccin était aussi efficace dans la promotion de la phagocytose de *C. neoformans* par des cellules effectrices en culture prélevées chez des volontaires humains. Les études cliniques ont été arrêtées pour des raisons autres que l'efficacité ou la sécurité du vaccin (Pirofski 2001).

Le désavantage principal de l'immunisation passive à l'aide d'anticorps monoclonaux contre les polysaccharides capsulaires est le fait qu'ils sont peu efficaces chez des patients sidéens (Pirofski 2001). En effet, la famille d'anticorps monoclonaux contre GXM contient la région variable de la chaîne lourde VH3 (Datta and Pirofski 2006). Le problème avec ceci est que la gp120 se lie aux régions variables de VH3, ce qui réduirait l'efficacité de liaison des anticorps monoclonaux (Datta and Pirofski 2006).

La capsule n'est pas la seule cible antigénique pour la production d'anticorps monoclonaux. Il est aussi possible de créer des mimotopes, peptides qui miment par exemple le GXM (Datta and Pirofski 2006). P13 est un mimotope de GXM dont l'efficacité de la protection chez la souris contre une dose létale de *C. neoformans*, ainsi que lors d'une infection chronique déjà établie, a été démontrée (Datta, Lees et al. 2008). Il serait aussi possible d'utiliser des stratégies de vaccination qui combinent des antigènes mannosylés qui activent les récepteurs mannose et des ligands des TLRs. Cette technique a été testée sur des cellules dendritiques, ce qui a donné pour résultat l'augmentation de la réponse des cellules T CD4+ contre *C. neoformans* (Dan, Wang et al. 2008).

## CHAPITRE 3 : MODÈLES UTILISÉS POUR ÉTUDIER LA CRYPTOCCOCCOSE

### Modèles existants

L'étude avec des mini-modèles d'infection a permis de démontrer l'évolution de *Cryptococcus* qui est passé de saprophyte dans l'environnement à pathogène chez les animaux (Hull and Heitman 2002). *Acanthamoeba castellanii* est une amibe ayant la capacité de phagocyter *Cryptococcus* (Steenbergen, Shuman et al. 2001). Elle est similaire aux macrophages puisqu'elle a la capacité de phagocyter des particules dans des vacuoles et sécrète des enzymes lysosomales afin de digérer ces dernières (Steenbergen, Shuman et al. 2001). Elle est utilisée comme modèle afin d'étudier les interactions des phagocytes avec *C. neoformans*. Comme avec les macrophages, les souches sans capsule sont éliminées, alors que les souches ayant une capsule survivent et se répliquent dans l'amibe (Steenbergen, Shuman et al. 2001). Le fait que *C. neoformans* agisse de la même façon, autant chez les macrophages que chez *A. castellanii*, suggère que les caractéristiques qui contribuent à la virulence chez les mammifères sont une conséquence de l'adaptation de la levure pour permettre sa survie dans l'environnement (Steenbergen, Shuman et al. 2001).

*Drosophila melanogaster* est une mouche à fruits qui a été principalement utilisée afin d'étudier les défenses antifongiques médiées par les récepteurs Toll. Trois espèces de *Cryptococcus* ont été étudiées chez *D. melanogaster* : *C. neoformans*, *C. laurentii* et *C. kuetzingii* (London, Orozco et al. 2006). Il a été démontré que lorsque les levures sont injectées, elles ne sont pas virulentes (London, Orozco et al. 2006). Par contre, lorsqu'il y a ingestion des levures par la mouche, *C. neoformans* est virulent (London, Orozco et al. 2006). La mort des mouches par *C. neoformans* implique la participation de facteurs de virulence semblables à ceux qui causent la virulence chez les mammifères, par exemple les gènes appartenant aux cascades PKA et RAS (London, Orozco et al. 2006). De plus, lors de l'ingestion de *Cryptococcus*, les récepteurs Toll ne jouent pas de rôle dans la défense contre les levures, alors que

lorsqu'il y a injection systémique des levures, ils sont activés et jouent leur rôle dans la résistance de l'hôte comme avec d'autres infections fongiques, par exemple *Aspergillus fumigatus* ou *Candida albicans* (London, Orozco et al. 2006). Ceci indique donc que le mode d'infection joue un rôle dans l'activation des récepteurs Toll chez *D. melanogaster* (London, Orozco et al. 2006).

*Caenorhabditis elegans* est un nématode souvent utilisé pour étudier la pathogénèse bactérienne (Mylonakis, Ausubel et al. 2002). Il peut aussi être utilisé pour étudier la pathogénèse de *Cryptococcus* depuis que Mylonakis et ses collègues ont démontré que le nématode est capable d'ingérer la levure (Mylonakis, Ausubel et al. 2002). *C. elegans* est capable d'ingérer *C. neoformans*, *C. laurentii* et *C. kuetzingii*, mais seul *C. neoformans* est virulent (Mylonakis, Ausubel et al. 2002). La mort du nématode causé par *C. neoformans* dépend de la présence de sa capsule, du type sexuel MAT $\alpha$ , de la laccase (LAC1) ainsi que des gènes modulant plusieurs cascades de signalisation (GPA1, PKA1, BRK1, RAS1). Puisque ces facteurs sont aussi importants dans la virulence chez les mammifères, il est encore possible de démontrer que l'adaptation de *C. neoformans* pour sa survie à l'intérieur de prédateurs de l'environnement a contribué à sa virulence chez les animaux (Mylonakis, Ausubel et al. 2002).

Le principal désavantage des études avec les mini-modèles est que ces derniers ne possèdent pas de réponse adaptative (Chamilos, Lionakis et al. 2007). Des modèles animaux chez les mammifères ont donc été établis afin d'étudier la pathogénèse de l'infection au *Cryptococcus*.

Les modèles animaux utilisés pour étudier l'infection de *Cryptococcus* sont très variés. Les modèles les plus utilisés sont les modèles d'infection systémique chez la souris par injection intraveineuse de la queue, les modèles d'infection par inhalation chez le rat et la souris et les modèles d'infection intracérébrale chez le lapin (Hull and Heitman 2002). Les plus gros animaux (rat, lapins) sont préférés aux plus petits pour les études de la méningo-encéphalite puisque leur taille rend le cerveau plus accessible (Carroll, Guillot et al. 2007). Les souris sont préférées pour l'étude de la

pneumonie en raison des faibles coûts et de l'excellente compréhension de leur immunologie (Carroll, Guillot et al. 2007).

Le cochon d'Inde a été le premier mammifère utilisé pour l'étude de l'infection par *Cryptococcus* (Carroll, Guillot et al. 2007). Il a déjà été utilisé pour étudier l'infection par d'autres pathogènes fongiques, par exemple *Candida albicans* (Carroll, Guillot et al. 2007). Il ne requiert pas d'immunosuppression pour être infecté et sa nature docile permet d'effectuer les infections sans problèmes (Carroll, Guillot et al. 2007). Il a été démontré que les femelles sont plus résistantes à l'infection, ce qui est le cas chez l'homme (Carroll, Guillot et al. 2007). Par contre, contrairement aux macrophages alvéolaires humains ou murins, ceux du cochon d'Inde sont incapables d'éliminer les souches sans capsule de *C. neoformans* et les souches encapsulées inhibent complètement la phagocytose par les macrophages alvéolaires du cochon d'Inde (Carroll, Guillot et al. 2007). Le nombre limité de lignées génétiques disponibles est aussi un désavantage de l'utilisation du cochon d'Inde (Carroll, Guillot et al. 2007).

Le lapin a besoin d'être immunodéprimé avec des stéroïdes afin que l'infection puisse s'établir, ce qui est similaire aux infections par *Cryptococcus* chez des patients ayant par exemple reçu une greffe d'organe et qui doivent être traités aux corticostéroïdes (Hull and Heitman 2002). Le lapin est surtout utilisé pour étudier la méningo-encéphalite puisqu'il est possible de prélever plusieurs fois de grands échantillons de LCR et de levures en raison de la grande taille et de l'accessibilité du cerveau (Hull and Heitman 2002; Carroll, Guillot et al. 2007). Par contre, le coût d'achat de ces animaux, la haute dose infectieuse requise et le fait que les lapins doivent être immunodéprimés rendent ce modèle très dispendieux (Carroll, Guillot et al. 2007). De plus, la température corporelle du lapin (39°C) ne correspond pas à celle de l'homme, ce qui peut entraîner des divergences lors de l'étude de l'infection (Hull and Heitman 2002). La fondation génétique et immunologique est aussi limitée en comparaison avec d'autres espèces comme la souris (Carroll, Guillot et al. 2007).

Les modèles d'infection par inhalation ou injection intra-trachéale du rat sont surtout utilisés pour étudier la dissémination et la latence, puisque l'infection par

*Cryptococcus* provoque l'établissement d'une infection chronique très similaire à celle chez l'homme (Hull and Heitman 2002). L'activité des macrophages est similaire à celle de la souris mis-à-part la présence d'une poussée oxydative plus forte et une plus grande restriction de la croissance intracellulaire de la levure (Carroll, Guillot et al. 2007). Un des avantages du rat est que sa grosseur permet des infections intra-trachéales sans chirurgie (Carroll, Guillot et al. 2007). De plus, il est plus résistant à l'infection pulmonaire comparativement à la souris ce qui permet l'étude de la persistance de *Cryptococcus* dans les poumons (Carroll, Guillot et al. 2007). Le principal désavantage des modèles de rat est qu'ils sont plus coûteux que les souris au niveau de l'acquisition et de l'entretien des animaux (Carroll, Guillot et al. 2007).

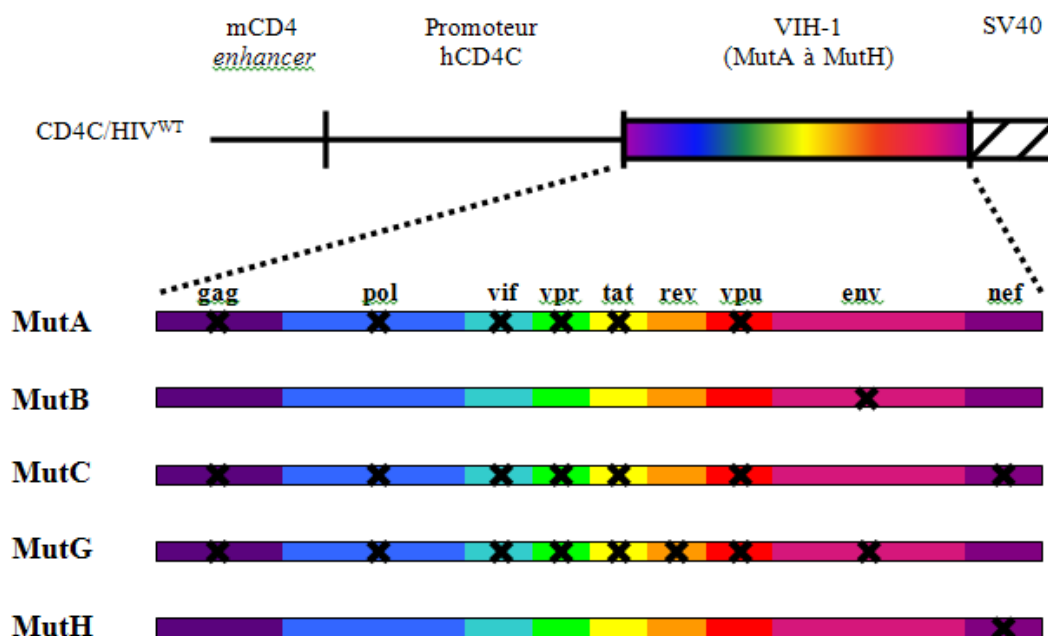
La souris est l'animal le plus utilisé pour étudier l'infection par *Cryptococcus* (Carroll, Guillot et al. 2007). Les avantages des modèles murins sont le coût relativement faible et la petite taille des animaux qui permet une manipulation facile, la disponibilité de diverses souches appartenant à plusieurs backgrounds génétiques, et un grand nombre d'outils disponibles pour étudier l'immunologie et la génétique (Hull and Heitman 2002). De plus, le fait que l'infection par *Cryptococcus* chez la souris est très similaire à celle de l'homme est aussi un grand avantage pour le choix de cet animal (Carroll, Guillot et al. 2007). En effet, la réponse immunitaire induite par la dissémination de *C. neoformans* chez la souris est très similaire à celle chez des patients sidéens (Lortholary, Improvisi et al. 1999). Le principal désavantage de la souris est sa petite taille qui pourrait rendre les infections plus difficiles (Carroll, Guillot et al. 2007). Il faut toutefois faire attention au mode d'infection et au background génétique de la souris, puisque la virulence de la levure va différer selon ces deux facteurs (Zaragoza, Alvarez et al. 2007). Par exemple, les souris CBA/J sont plus susceptibles que les BABL/C à l'infection intra-trachéale de *C. neoformans*, mais il n'y a pas de différence dans la susceptibilité lors d'une infection par la voie intraveineuse (Zaragoza, Alvarez et al. 2007). Il est aussi important de noter que pour étudier l'infection de *Cryptococcus* de façon optimale, il faudrait toujours infecter par voie intra-nasale, puisque c'est par cette porte d'entrée que l'homme est infecté par la levure (Kronstad, Attarian et al. 2011).



### La souris CD4C/HIV<sup>Mut</sup>

Différents modèles de souris transgéniques ont été créés afin d'étudier l'infection au VIH-1 (Brady, Pennington et al. 1994). Par contre, la plupart de ceux-ci étaient trop différents de l'infection réelle chez l'homme (Brady, Pennington et al. 1994). Puisque la souris est résistante au VIH-1 humain, il fallait donc trouver une façon de reproduire le plus précisément possible l'infection au VIH-1 chez l'homme dans un modèle de souris transgénique.

Hanna et ses collègues ont construit une souris Tg (sur background génétique C3H) exprimant l'entière séquence codant pour le VIH-1, dans les cellules ciblées par ce dernier chez l'homme, soit les lymphocytes T CD4+, les lymphocytes T CD4+CD8+ thymiques, les cellules dendritiques et les macrophages (Figure 5) (Hanna, Kay et al. 1998). La séquence est régulée par le promoteur humain CD4 et *l'enhancer* CD4 murin (Hanna, Kay et al. 1998). Ces souris CD4C/HIV<sup>wt</sup> développent une maladie très similaire au SIDA (plus précisément le SIDA pédiatrique) caractérisée par une atrophie thymique, la perte des lymphocytes T CD4+ circulants et des cellules dendritiques matures, une accumulation de cellules dendritiques immatures, une perte de l'architecture des organes lymphoïdes, un retard pondéral, un dépérissement, de la diarrhée, une pneumonite lymphocytaire interstitielle, une néphrite tubulo-interstitielle et une mort prématurée aussi tôt que 1 mois (Hanna, Kay et al. 1998; Poudrier, Weng et al. 2003). De plus, il y a surexpression de Fas et FasL sur les lymphocytes T ainsi qu'une hausse de l'apoptose chez ces cellules (Priceputu, Rodrigue et al. 2005). La sévérité de la maladie corrèle avec le niveau d'expression du transgène, ce qui est similaire au niveau de réplication du VIH-1 et la progression de la maladie vers le SIDA chez l'homme (Hanna, Kay et al. 1998).



**Figure 5. Construction des souris transgéniques CD4C/HIV<sup>Mut</sup>.** Les X représentent la délétion des gènes indiqués, chez les constructions Mut A, B, C, G et H. Inspiré de (Hanna, Kay et al. 1998).

Les mêmes chercheurs ont démontré que *nef* est nécessaire et essentiel pour induire la maladie apparentée au SIDA chez la souris Tg (Hanna, Kay et al. 1998). Cinq mutants ont été construits (CD4C/HIV<sup>MutA, B, C, G, H</sup>) afin de déterminer lequel ou lesquels des gènes étaient essentiels (Figure 5). L'apparition de la maladie chez la souris CD4C/HIV<sup>MutA</sup>, qui exprime *nef*, *env* et *rev*, a permis de confirmer que tous les autres gènes ne sont pas requis. CD4C/HIV<sup>MutB</sup>, qui exprime uniquement *env*, et CD4C/HIV<sup>MutC</sup>, qui exprime *env* et *rev*, ont permis de confirmer que seul *nef* est requis pour induire la maladie (Hanna, Kay et al. 1998). L'induction de la maladie chez la souris CD4C/HIV<sup>MutG</sup>, qui n'exprime que *nef*, et l'absence de la maladie chez CD4C/HIV<sup>MutH</sup>, qui exprime tous les gènes sauf *nef*, confirme une fois de plus que seul *nef* est nécessaire pour induire la maladie (Hanna, Kay et al. 1998).

De tous les mutants, la souris CD4C/HIV<sup>MutA</sup> est idéale puisque la maladie se développe généralement entre 30 jours à 16 mois depuis la naissance (Hanna, Kay et al. 1998). Cette souris Tg n'a jamais jusqu'à maintenant été utilisée pour étudier l'infection par *C. neoformans* et *C. gattii*.

## HYPOTHÈSE

La cryptococcose est une infection fongique opportuniste chez les individus infectés au VIH-1. *C. neoformans* est le plus souvent en cause chez ces individus, comparativement au *C. gattii* qui infecte surtout les individus immunocompétents. Nous proposons donc l'hypothèse que la souris CD4C/HIV<sup>MutA</sup> exprimant le génome du VIH-1 présente une susceptibilité accrue à la cryptococcose, mais de façon plus marquée à l'égard de *C. neoformans* comparativement à *C. gattii*, ainsi qu'une réponse immunitaire défectueuse à l'égard de *Cryptococcus*.

## OBJECTIFS

Les objectifs sont de démontrer une différence significative au niveau de la survie, de la réponse inflammatoire et du recrutement cellulaire pulmonaire en fonction de la présence du transgène et de l'espèce de *Cryptococcus* inoculée. L'immunopathogenèse de la cryptococcose sera étudiée de 3 façons chez la souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> exprimant les gènes nef, env et rev du VIH-1.

1. La virulence (souches *C. neoformans* H99 et C23, *C. gattii* R265 et R272) sera comparée après infection intra-nasale de souris Tg et non-Tg, en mesurant les temps de survie et les décomptes de CFU dans les organes profonds. Ceci permettra d'établir les différences et similitudes entre les espèces de *Cryptococcus* et groupes de souris.
2. La pathologie de l'infection et les charges de *Cryptococcus* dans les organes profonds seront comparées à des temps fixes après l'infection. Ceci permettra de mettre en évidence la distribution et l'étendue de la dissémination systémique de *Cryptococcus* à un temps fixe.
3. Le recrutement pulmonaire de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, de cellules dendritiques, de macrophages et de neutrophiles sera comparé par cytométrie en flux chez les deux groupes de souris. Il sera donc possible de comparer la réponse immunitaire déclenchée par *C. neoformans* et *C. gattii*, tant chez la souris Tg que non-Tg.

## CHAPITRE 4 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

### Modèle animal

Les souris CD4C/HIV<sup>MutA</sup> Tg expriment les produits fonctionnels des gènes nef, env et rev du VIH-1. Ces dernières ainsi que les souris témoins non-Tg sont de lignée génétique C3H. Elles sont certifiées dépourvues de pathogènes. Elles sont hébergées dans des micro-isolateurs stériles à l'animalerie G-5 de l'Université de Montréal, où la température, l'humidité et le cycle lumineux des salles sont contrôlés. La colonie est maintenue par Francine Aumont, du laboratoire du Dr. Louis de Repentigny. À noter que la salle de protocole expérimental est séparée de la salle de colonie.

La reproduction est assurée par des mâles Tg de la colonie mis en contact avec des femelles C3H provenant de la compagnie Harlan. Les mâles reproducteurs, ainsi que les parents de ces derniers, doivent être libres de signes infectieux. La présence du transgène est détectée par PCR en utilisant des oligonucléotides spécifiques et l'observation d'un ou de deux produits d'amplification, un représentant le gène fonctionnel et l'autre le gène muté lors de l'insertion du transgène sur le gel de polyacrylamide confirme respectivement l'absence ou la présence du transgène chez la souris.

La première expérience comprenait des groupes de trois souris Tg et trois non-Tg des deux sexes. L'ensemble des expériences suivantes comprenait des groupes de six souris Tg et six non-Tg des deux sexes. L'âge des souris se situait entre 42 jours et 65 jours. Les groupes sont composés selon deux critères : l'infection au *C. neoformans* ou *C. gattii* et la présence ou l'absence du transgène. Des groupes témoins non-Tg non-infectés (inoculation de PBS stérile) accompagnent toujours les groupes Tg infectés.

### Infection des souris au *C. neoformans* et au *C. gattii*

Les souches de *C. neoformans* var. *grubii* (sérotypage A) de type moléculaire VNI utilisées sont les suivantes : H99, qui a été isolée pour la première fois du liquide céphalorachidien d'un patient atteint d'infection au VIH-1, et C23, qui a été isolée d'un lavage broncho-alvéolaire chez un receveur de greffe pulmonaire (Litvintseva and Mitchell 2009). Les souches de *C. gattii*, R265 et R272, appartenant respectivement aux types moléculaires VGIIa et VGIIb, ont toutes les deux été isolées de lavages broncho-alvéolaires de patients immunocompétents infectés sur l'Île de Vancouver (Kidd, Hagen et al. 2004). Les quatre souches nous ont été fournies par le Dr. James Kronstad de l'Université de la Colombie-Britannique.

Toutes les souches sont conservées à -80°C. Deux jours avant l'infection, les souches doivent être dégelées et ensemencées par épuisement sur des géloses YPD (*yeast-peptone-dextrose*). Ces géloses sont incubées à 30°C durant deux jours. Après l'incubation, quelques colonies prélevées sur une gélose sont mises en culture dans 10 ml de YPD liquide, et est incubé avec agitation à 35°C pour 18 heures. Deux lavages avec 10 ml de PBS stérile (10mM, pH 7,4), avec centrifugation à 2000 x g pendant cinq minutes, sont effectués. Après resuspension dans 10 ml de PBS stérile, un décompte cellulaire est effectué à l'aide d'un hématimètre. Selon l'espèce de *Cryptococcus* et l'expérience, un inoculum spécifique sera nécessaire pour l'infection. Le volume requis est ajouté à un volume défini de PBS stérile pour obtenir 1 ml de suspension dans un tube Eppendorf. 50µl prélevés avec une pipette correspond à l'inoculum nécessaire pour l'infection d'une souris.

L'inoculation des souris est effectuée sous une hotte biologique de l'animalerie. Les souris doivent tout d'abord être anesthésiées par injection intra-péritonéale de 100 à 150 µl (selon le poids de la souris) d'une solution de kétamine/xylazine (1,5 ml de kétamine 100mg/ml (Bioniche, Belleville, ON), 0,1 ml de xylazine 100mg/ml (Bimeda-MTC, Cambridge, ON) et 8,5 ml de solution saline stérile). Les souris anesthésiées sont suspendues par les incisives sur un fil de nylon stérile attaché de part et d'autre de l'ouverture à la face supérieure d'une boîte creuse de polystyrène (comme une corde-à-linge), afin d'assurer une bonne extension de la trachée et de

prévenir la déglutition de l'inoculum. 50µl sont prélevés de l'Eppendorf à l'aide d'une pipette, et la suspension de levures est doucement déposée dans les narines des souris. Il faut par la suite laisser les souris suspendues pendant dix minutes afin de permettre à un plus grand nombre possible de levures d'atteindre les poumons. Pour les études de survie, les souris demeurent en isolation jusqu'à ce qu'elles atteignent les points limites d'euthanasie. Pour les autres expériences, elles demeurent en isolation jusqu'à l'euthanasie, soit 7 ou 14 jours après l'infection.

### Études de survie

Pour déterminer la survie des souris infectées au *C. neoformans* ou au *C. gattii*, trois groupes de souris (dix souris Tg et dix souris non-Tg) ont été inoculées à l'aide de  $1.25 \times 10^4$  CFU,  $1.25 \times 10^5$  CFU ou  $1.25 \times 10^6$  CFU, pour chacune des quatre souches de *Cryptococcus*. Soixante souris ont donc été inoculées par souche pour cette étude de survie. Suite à l'infection, les souris sont évaluées quotidiennement afin de déterminer si elles atteignent un ou plusieurs des points limites. Les points limites utilisés proviennent de ceux établis par le *UBC Animal Care Center*. Les caractéristiques physiques (perte de poids, position recourbée, mauvais état du pelage, paralysie, difficulté respiratoire) et comportementales (réduction de l'activité, réponse réduite à des stimuli) sont soigneusement observés tous les jours. Certains points limites conduisent à une euthanasie immédiate: perte de poids de  $\geq 20\%$ , immobilité, tremblements et vocalisation, pas de réponse aux stimuli, paralysie et/ou respiration difficile.

### Prélèvement et préparation des organes pour décompte des unités formatrices de colonies (CFUs)

Après l'atteinte des points limites ou du temps d'infection prévu, les souris sont anesthésiées par une injection intra-péritonéale létale de kétamine/xylazine (100 µl par 10g de poids corporel). Toutes les manipulations sont effectuées sous une hotte

biologique (confinement P2). Une fois les souris décédées, la rate, le foie, les poumons et le cerveau sont prélevés à l'aide de ciseaux et de pinces stériles. Les organes sont pesés et chacun est placé dans un mortier contenant un peu de sable stérile et 3 ml de PBS stérile. Les organes sont broyés avec le pilon. Des dilutions 1/10, 1/50, 1/100 (rate, foie), 1/10, 1/50, 1/1000 (cerveau) et 1/100, 1/1000 et 1/10000 (poumons) sont effectuées avec du PBS stérile. 200 $\mu$ l de chacune de ces dilutions sont étendus sur des géloses YPD à l'aide de billes stériles. Les géloses sont incubées 48 heures à 30°C. Les unités formatrices de colonies de chaque Pétri sont ensuite comptées.

#### Préparation des organes pour l'histopathologie

Pour l'infection des souris pour les fins de l'histopathologie, seules les souches *C. neoformans* H99 et *C. gattii* R265 ont été utilisées, puisque la première est représentative des souches causant la grande majorité des infections chez les patients sidéens, et la seconde des personnes immunocompétentes infectées en Colombie-Britannique. Un seul inoculum par souche a été utilisé, soit  $1.25 \times 10^4$  pour H99 et  $1.25 \times 10^5$  pour R265, puisque c'est à ces deux inoculums que l'écart de survie était le plus grand entre les souris Tg et non-Tg. De plus, les souris ont été euthanasiées aux temps fixes de 7 jours ou 14 jours, 7 jours correspondant à la réponse innée et 14 jours à la réponse adaptative à l'égard de *Cryptococcus*. Six souris Tg et six souris non-Tg ont été inoculées pour chacun de ces deux temps d'infection et ce, pour les deux souches. Mis-à-part le cerveau et les poumons, les étapes de prélèvement et de préparation des organes pour le décompte des CFUs sont les mêmes que ci-haut. Pour ce qui est du cerveau et des poumons, ces derniers ont dû être prélevés en entier (sans coupure ou déchirure). Les deux organes sont ensuite coupés en deux. Une des moitiés a été préparée pour l'ensemencement sur gélose YPD et le décompte des CFUs (ci-haut), et l'autre moitié a été déposée dans une solution de formaline 10% (Chaptee), placée à 4°C pendant 48 heures, et transportée à la plateforme d'histologie de l'IRIC de l'Université de Montréal pour la préparation de coupes

histopathologiques colorées à la mucicarminé (coloration des capsules) ou au HPS (coloration classique).

#### Mesure de l'épaisseur des capsules

Des coupes histopathologiques, colorées à la mucicarminé, des poumons de souris Tg et non-Tg, infectées au *C. neoformans* H99 et au *C. gattii* R265, sont digitalisées et analysées à l'aide du logiciel *NanoZoomer Digital Pathology* (Hamamatsu). Le diamètre des corps cellulaires ainsi que l'épaisseur des capsules de 100 levures choisies aléatoirement ont été mesurés pour ces deux souches aux jours 7 et 14 après l'inoculation.

#### Cytométrie en flux des populations de cellules immunitaires pulmonaires

Pour l'étude des populations cellulaires, seuls *C. neoformans* H99 et *C. gatti* R265 ont été utilisés. Toutes les manipulations ont été effectuées sous une hotte biologique (confinement P2). L'infection a été effectuée au même inoculum que pour l'étude d'histopathologie. Un seul temps d'observation a été étudié, soit 7 jours après l'infection. Six souris Tg et six souris non-Tg ont été infectées avec chacune des deux souches. Après l'anesthésie létale, le sang de la souris est remplacé par du NaCl 0.9% stérile en perfusion et les poumons sont prélevés. Ils sont broyés dans un mortier contenant 3ml de PBS stérile. Le broyat est transféré dans un tube conique et incubé avec 1ml de mélange de RPMI et FBS (5%) contenant 1% (m/v) de collagénase sur une plaque agitatrice à 37°C pendant 1 heure. À toutes les 15 minutes, le broyat est agité manuellement. Le broyat est ensuite filtré dans une seringue de 10ml avec un embout contenant un filtre de nylon de 80µm. Trois ml de PBS stérile sont filtrés afin de nettoyer le filtre de nylon. Le tube est ensuite centrifugé à 137,5 x g pendant 10 minutes. Le surnageant est retiré et le culot de cellules est resuspendu dans 3 ml de PBS stérile. 250µl de suspension cellulaire sont déposés dans chacun de 11 tubes de FACS. Les cellules sont prêtes à être marquées.



**Tableau I – Anticorps utilisés pour l’analyse des cellules immunitaires en cytométrie en flux**

<b>Anticorps</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Source</b>	<b>No. de produit</b>
CD45	PE	Biologend	103106
<b>Macrophages et cellules dendritiques</b>			
CD11b	APC	Biologend	101211
CD11c	PE/Cy7	Biologend	117318
F4/80	FITC	Biologend	123108
isotype	APC	Biologend	400612
isotype	PE/Cy7	Biologend	400922
isotype	FITC	Biologend	400506
<b>PMNS</b>			
CD3	FITC	Biologend	100204
Gr-1	PE/Cy7	Biologend	108416
isotype	FITC	Biologend	108416
isotype	PE/Cy7	Biologend	400618
<b>Lymphocytes T CD4+/TCD8+</b>			
CD4	FITC	Biologend	100406
CD8	PE/Cy7	Biologend	100722
isotype	FITC	Biologend	400606
isotype	PE/Cy7	Biologend	400522

Les cellules immunitaires à l’étude nécessitent un marquage à l’aide de plusieurs anticorps (Tableau I). Les anticorps et isotypes contrôles correspondants (Tableau II) sont mis dans chaque tube et il y a incubation à 4°C pendant 30 minutes. Après l’incubation, 2 ml de solution de lyse (BD Biosciences), afin de lyser les globules rouges (permettant une lecture claire en cytométrie en flux) et fixer les cellules, est mis dans chaque tube et il y a incubation à température pièce et à la noirceur pendant 10 minutes. On ajoute ensuite 1 ml de PBS stérile dans les tubes afin de diluer la solution de lyse, on centrifuge 10 minutes à 137,5 x g, et on procède à un autre lavage au PBS stérile. Les surnageants sont retirés et les tubes contrôles sont resuspendus dans 400 µl de PBS stérile et les tubes expérimentaux dans 250 µl de PBS stérile. Les tubes 1 à 6, 8 et 10 sont des contrôles servant au calibrage de l’appareil, tandis que les tubes 7, 9 et 11 contiennent les échantillons à tester. À noter que les tubes 2 et 5 servent à marquer les cellules CD45+. Ces cellules seront

utilisées comme base pour mesurer le % des populations cellulaires recrutées. Les tubes sont maintenant prêts pour la lecture au FACSCalibur (BD Biosciences) relié à un ordinateur pourvu du logiciel CellQuest.

**Tableau II – Combinaisons d’anticorps utilisés pour l’analyse des populations cellulaires en cytométrie en flux**

Poumons	
Tube	Anticorps
1	Cellules seules
2	CD45
3	CD45 + CD11b
4	CD45 + CD11c
5	CD45 + F4/80
6	CD45 + isotypes (Macrophages)
7	CD45 + CD11b + CD11c + F4/80
8	CD45 + isotypes (TCD4/TCD8)
9	CD45 + CD4 + CD8
10	CD45 + isotypes (PMNs)
11	CD45 + CD3 + Gr-1

### Analyse statistique

La méthode de Kaplan-Meier ainsi que le test de Mantel-Cox (*Log rank*) ont été utilisés afin de comparer les fonctions de survie de souris Tg ou non-Tg infectées au *C. neoformans* var. *grubii* ou au *C. gattii*. Les charges fongiques de *Cryptococcus* dans les organes ont été comparées à l’aide du test de Kruskal-Wallis, et les interactions significatives ont été analysées à partir du test de Mann-Whitney. Les diamètres des corps cellulaires, l’épaisseur de la capsule, et les immunophénotypes des populations de cellules pulmonaires ont été analysées par une analyse de variance à l’aide du programme SPSS version 19 (SPSS, Chicago, IL). Une différence est considérée comme significative lorsque  $p < 0.05$ .

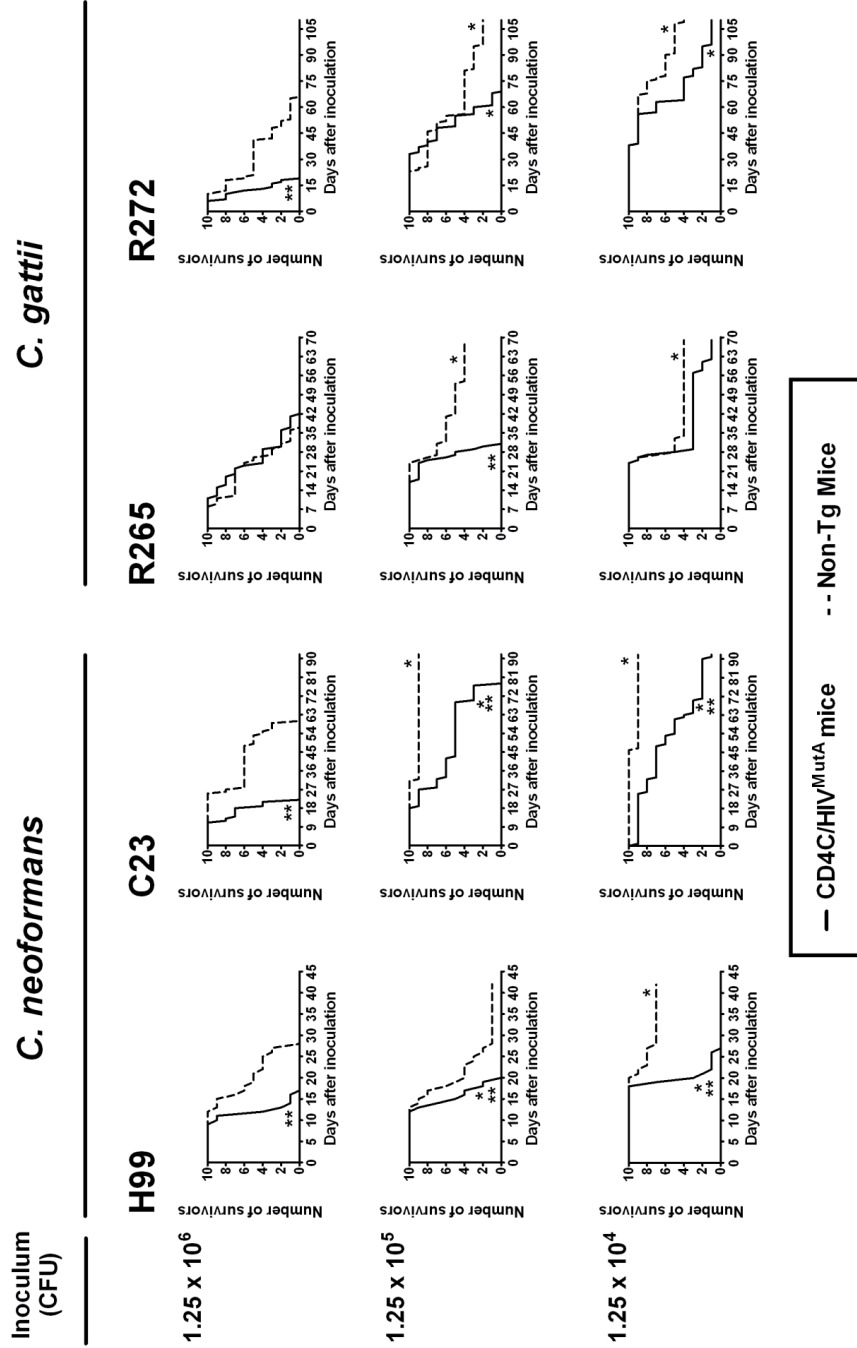
## CHAPITRE 5 : RÉSULTATS

### Infection des souris au *C. neoformans* et au *C. gattii*

Afin d'étudier la survie des souris infectées au *C. neoformans* ou au *C. gattii*, nous avons infecté des groupes de dix souris Tg et dix souris non-Tg à chacun des trois inoculum étudiés ( $1.25 \times 10^4$ ,  $1.25 \times 10^5$  ou  $1.25 \times 10^6$ ) et ce, pour chaque souche à l'étude (*C. neoformans* H99 et C23, *C. gattii* R265 et R272). Les souris étaient âgées entre 42 et 69 jours. Les courbes de survie sont présentées à la figure 6.

La survie des souris (Tg ou non) est inversement corrélée avec la charge de l'inoculum ( $p < 0.01$ ), sauf pour les souris Tg infectées au *C. gattii* R265. *C. neoformans* C23 était moins virulent que *C. neoformans* H99 ( $p < 0.03$ ). Les souris Tg infectées au *C. neoformans* sont mortes plus rapidement que les non-Tg, tant pour la souche H99 que C23, et ce aux trois inocula étudiés. Pour ce qui est des souris infectées au *C. gattii* R265 ou R272, les Tg sont mortes plus rapidement à un seul des inocula plus élevés, soit  $1.25 \times 10^5$  CFU pour R265 et  $1.26 \times 10^6$  pour R272. La plus grande différence entre la mortalité des souris Tg versus non-Tg s'est produite à l'inoculum le plus faible ( $1.25 \times 10^4$  CFU) pour les deux souches de *C. neoformans*. En effet, pour H99, 70% des souris non-Tg ont survécu jusqu'à la fin de l'expérience, tandis que toutes les Tg sont mortes. Pour ce qui est de C23, 90% des souris Tg sont mortes versus seulement 10% de mortalité chez les non-Tg. Il n'y a donc pas de différence aussi flagrante entre la mortalité des souris Tg et des non-Tg infectées au *C. gattii*.

Les CFUs de *Cryptococcus* dans quatre organes (cerveau, poumons, foie, rate) ont été déterminés à la mort des souris utilisées dans l'étude de survie (Tableaux III - VI).



**Figure 6 – Courbes de mortalité chez les souris transgéniques CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-transgéniques infectées au *C. neoformans* H99 ou C23, ou *C. gattii* R265 ou R272, à trois inocula différents.** Pour chaque souche, 10 souris Tg et non-Tg ont été infectées par voie intra-nasale avec un inoculum de  $1.25 \times 10^4$ ,  $1.25 \times 10^5$ , ou  $1.25 \times 10^6$ . Les souris sont euthanasiées à l'atteinte des points limite ou la fin de l'expérience (H99 : 60 jours, C23 : 92 jours, R265 : 69 jours, R272 : 110 jours). \* Indique une différence de mortalité significative ( $p < 0.01$ ) vs les souris infectées avec la même souche à  $1.25 \times 10^6$ . \*\* Indique une différence de mortalité significative ( $p < 0.01$ ) de ces souris Tg vs non-Tg infectées avec le même inoculum de la même souche. Statistiques : Kaplan-Meier et Mantel-Cox (*log rank*)

Tableau III. Unités formatrices de colonies (CFUs) dans les organes de souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV<sup>Muta</sup> inoculées par voie intra-nasale avec *Cryptococcus neoformans* souche H99

Variable	Tg		Souris <sup>a</sup>		Contrôle non-Tg	
	1.25x10 <sup>6</sup> 10	1.25x10 <sup>3</sup> 10	1.25x10 <sup>4</sup> 10	1.25x10 <sup>6</sup> 10	1.25x10 <sup>3</sup> 10	1.25x10 <sup>4</sup> 10
Inoculum (Cfu)						
Nb inoculé						
Age à l'inoculation, moyenne des jours (écart)	59 (49-63)	54 (50-57)	60 (50-64)	49 (42-63)	53 (45-67)	61 (50-64)
Age à l'évaluation, moyenne des jours (écart)	72 (61-80) <sup>b</sup>	70 (64-75) <sup>b</sup>	80 (70-84) <sup>b</sup>	70 (58-80) <sup>b</sup>	76 (65-93) <sup>c</sup>	96 (73-106) <sup>c</sup>
Cultures d'organes positifs pour <i>C. neoformans</i>						
Cerveau						
Nb de souris	7	9	9	10	8	5
Décompte <i>C. neoformans</i> cfu/g	8.8x10 <sup>7</sup>	2.5x10 <sup>7</sup>	7.1x10 <sup>7</sup>	6.0x10 <sup>7</sup>	5.3x10 <sup>7</sup>	6.2x10 <sup>7</sup>
Écart	7.4x10 <sup>3</sup> - 3.8x10 <sup>8</sup>	1.4x10 <sup>4</sup> - 1.0x10 <sup>8</sup>	2.7x10 <sup>4</sup> - 2.8x10 <sup>8</sup>	3.3x10 <sup>3</sup> - 1.6x10 <sup>8</sup>	2.7x10 <sup>4</sup> - 1.3x10 <sup>8</sup>	7.9x10 <sup>4</sup> - 2.0x10 <sup>8</sup>
Poumons						
Nb de souris	9	10	9	10	9	6
Décompte <i>C. neoformans</i> cfu/g	2.0x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>8</sup>	2.5x10 <sup>8</sup>	1.2x10 <sup>8</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>	3.8x10 <sup>8</sup>
Écart	2.7x10 <sup>8</sup> - 8.7x10 <sup>9</sup>	1.8x10 <sup>7</sup> - 5.0x10 <sup>9</sup>	9.6x10 <sup>7</sup> - 4.7x10 <sup>9</sup>	8.6x10 <sup>7</sup> - 5.4x10 <sup>9</sup>	6.2x10 <sup>6</sup> - 6.3x10 <sup>9</sup>	6.9x10 <sup>5</sup> - 6.9x10 <sup>9</sup>
Foie						
Nb de souris	9	10	9	10	9	4
Décompte <i>C. neoformans</i> cfu/g	4.6x10 <sup>5</sup>	1.3x10 <sup>5</sup>	3.5x10 <sup>5</sup>	2.9x10 <sup>5</sup>	8.8x10 <sup>4</sup>	7.3x10 <sup>4</sup>
Écart	2.5x10 <sup>4</sup> - 2.5x10 <sup>6</sup>	4.2x10 <sup>4</sup> - 7.6x10 <sup>6</sup>	1.3x10 <sup>5</sup> - 6.5x10 <sup>5</sup>	2.9x10 <sup>4</sup> - 8.4x10 <sup>5</sup>	1.1x10 <sup>4</sup> - 3.2x10 <sup>5</sup>	1.9x10 <sup>4</sup> - 2.1x10 <sup>5</sup>
Rate						
Nb de souris	8	9	9	10	8	3
Décompte <i>C. neoformans</i> cfu/g	3.6x10 <sup>6</sup>	1.5x10 <sup>6</sup>	1.5x10 <sup>6</sup>	4.0x10 <sup>5</sup>	2.2x10 <sup>5</sup>	6.0x10 <sup>4</sup>
Écart	1.1x10 <sup>2</sup> - 2.2x10 <sup>7</sup>	2.3x10 <sup>2</sup> - 2.8x10 <sup>6</sup>	3.6x10 <sup>2</sup> - 4.0x10 <sup>6</sup>	5.4x10 <sup>4</sup> - 1.1x10 <sup>6</sup>	1.8x10 <sup>4</sup> - 6.5x10 <sup>5</sup>	9.1x10 <sup>3</sup> - 1.2x10 <sup>7</sup>

NA, non applicable

<sup>a</sup> souris étudiées incluent des Tg et contrôles non-Tg provenant de la souris fondatrice F21388<sup>b</sup> évaluation le jour de l'euthanasie en raison de l'atteinte des points limite (maladie)<sup>c</sup> évaluation le jour de l'euthanasie en raison de l'atteinte des points limite (maladie); les souris survivantes ont été euthanasiées 60 jours après l'inoculation avec *C. neoformans*

Tableau IV. Unités formatrices de colonies (CFUs) dans les organes de souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV<sup>MutA</sup> inoculées par voie intra-nasale avec *Cryptococcus neoformans* souche C23

Variable	Souris <sup>a</sup>		Souris <sup>a</sup>	
	Tg	Contrôle non-Tg	Tg	Contrôle non-Tg
Inoculum (Cfu)	1.25x10 <sup>6</sup>	1.25x10 <sup>6</sup>	1.25x10 <sup>6</sup>	1.25x10 <sup>6</sup>
Nb inoculé	10	10	10	10
Age à l'inoculation, moyenne des jours (écart)	53 (50-56)	46 (43-52)	45 (43-57)	49 (49-50)
Age à l'évaluation, moyenne des jours (écart)	71 (62-77) <sup>b</sup>	100 (53-135) <sup>c</sup>	90 (69-113) <sup>b</sup>	135 (81-142) <sup>c</sup>
Cultures d'organes positifs pour <i>C. neoformans</i>				
Cerveau				
Nb de souris	8	7	6	0
Décompte <i>C. neoformans</i> cfu/g	2.2x10 <sup>7</sup>	4.4x10 <sup>6</sup>	1.2x10 <sup>7</sup>	NA
Écart	3.6x10 <sup>6</sup> - 7.1x10 <sup>7</sup>	5.9x10 <sup>5</sup> - 2.0x10 <sup>7</sup>	8.1x10 <sup>5</sup>	NA
Poumons				
Nb de souris	10	7	8	1
Décompte <i>C. neoformans</i> cfu/g	4.2x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>8</sup>	5.7x10 <sup>8</sup>	4.4x10 <sup>6</sup>
Écart	1.2x10 <sup>8</sup> - 9.4x10 <sup>8</sup>	7.7x10 <sup>5</sup> - 3.2x10 <sup>8</sup>	1.7x10 <sup>7</sup> - 1.5x10 <sup>9</sup>	NA
Foie				
Nb de souris	10	7	7	1
Décompte <i>C. neoformans</i> cfu/g	6.1x10 <sup>3</sup>	6.0x10 <sup>3</sup>	3.4x10 <sup>6</sup>	4.4x10 <sup>3</sup>
Écart	3.9x10 <sup>4</sup> - 2.5x10 <sup>6</sup>	1.5x10 <sup>3</sup> - 2.1x10 <sup>6</sup>	9.6x10 <sup>3</sup> - 8.6x10 <sup>6</sup>	NA
Rate				
Nb de souris	10	5	5	0
Décompte <i>C. neoformans</i> cfu/g	2.8x10 <sup>6</sup>	2.8x10 <sup>6</sup>	4.1x10 <sup>6</sup>	NA
Écart	1.8x10 <sup>7</sup> - 1.7x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>7</sup> - 7.7x10 <sup>6</sup>	1.6x10 <sup>7</sup> - 8.5x10 <sup>6</sup>	NA

NA, non applicable

<sup>a</sup> souris étudiées incluent des Tg et contrôles non-Tg provenant de la souris fondatrice F21388<sup>b</sup> évaluation le jour de l'euthanasie en raison de l'atteinte des points limite (maladie)<sup>c</sup> évaluation le jour de l'euthanasie en raison de l'atteinte des points limite (maladie); les souris survivantes ont été euthanasiées 92 jours après l'inoculation avec *C. neoformans*

Tableau V. Unités formatrices de colonies (CFUs) dans les organes de souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV<sup>MudS</sup> inoculées par voie intra-nasale avec *Cryptococcus gattii* souche R265

Variable	Souris <sup>a</sup>		Contrôle non-Tg	
	Tg		Tg	
Inoculum (Cfu)	1.25x10 <sup>6</sup>	1.25x10 <sup>3</sup>	1.25x10 <sup>6</sup>	1.25x10 <sup>3</sup>
Nb inoculé	10	10	10	10
Age à l'inoculation, moyenne des jours (écart)	57 (55-62)	57 (54-61)	56 (52-62)	53 (49-62)
Age à l'évaluation, moyenne des jours (écart)	83 (70-100) <sup>b</sup>	84 (72-91) <sup>b</sup>	79 (61-92) <sup>b</sup>	107 (83-130) <sup>c</sup>
				98 (74-131) <sup>c</sup>
Cultures d'organes positifs pour <i>C. gattii</i>				
Cerveau				
Nb de souris	6	6	4	3
Décompte <i>C. gattii</i> cfu/g	5.7x10 <sup>4</sup>	1.4x10 <sup>3</sup>	8.3x10 <sup>4</sup>	3.9x10 <sup>4</sup>
Écart	1.4x10 <sup>4</sup> - 2.2x10 <sup>5</sup>	6.1x10 <sup>3</sup> - 7.1x10 <sup>3</sup>	7.4x10 <sup>4</sup> - 2.9x10 <sup>5</sup>	6.1x10 <sup>3</sup> - 9.0x10 <sup>4</sup>
Poumons				
Nb de souris	10	10	9	7
Décompte <i>C. gattii</i> cfu/g	1.5x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>8</sup>	4.2x10 <sup>7</sup>
Écart	4.6x10 <sup>7</sup> - 3.8x10 <sup>8</sup>	7.7x10 <sup>7</sup> - 1.9x10 <sup>8</sup>	5.9x10 <sup>7</sup> - 3.2x10 <sup>8</sup>	1.1x10 <sup>7</sup> - 9.2x10 <sup>7</sup>
Foie				
Nb de souris	4	4	3	2
Décompte <i>C. gattii</i> cfu/g	1.3x10 <sup>6</sup>	1.5x10 <sup>6</sup>	3.3x10 <sup>4</sup>	6.2x10 <sup>3</sup>
Écart	1.8x10 <sup>3</sup> - 3.9x10 <sup>6</sup>	8.8x10 <sup>4</sup> - 4.3x10 <sup>6</sup>	1.4x10 <sup>4</sup> - 6.8x10 <sup>4</sup>	2.0x10 <sup>3</sup> - 1.0x10 <sup>4</sup>
Rate				
Nb de souris	1	0	1	0
Décompte <i>C. gattii</i> cfu/g	1.8x10 <sup>6</sup>	NA	3.1x10 <sup>7</sup>	NA
Écart	NA	NA	NA	NA

NA, non applicable

<sup>a</sup> souris étudiées incluent des Tg et contrôles non-Tg provenant de la souris fondatrice F21388<sup>b</sup> évaluation le jour de l'euthanasie en raison de l'atteinte des points limite (maladie)<sup>c</sup> évaluation le jour de l'euthanasie en raison de l'atteinte des points limite (maladie); les souris survivantes ont été euthanasées 69 jours après l'inoculation avec *C. gattii*

Tableau VI. Unités formatrices de colonies (CFUs) dans les organes de souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV<sup>Muta</sup> inoculées par voie intra-nasale avec *Cryptococcus gattii* souche R272

Variable	Souris <sup>a</sup>					
	Tg			Contrôle non-Tg		
Inoculum (Cfu)	1.25x10 <sup>6</sup>	1.25x10 <sup>5</sup>	1.25x10 <sup>4</sup>	1.25x10 <sup>6</sup>	1.25x10 <sup>5</sup>	1.25x10 <sup>4</sup>
Nb inoculé	10	10	10	10	10	10
Age à l'inoculation, moyenne des jours (écart)	53 (47-59)	64 (63-69)	49 (44-53)	56 (46-59)	63 (60-64)	59 (57-61)
Age à l'évaluation, moyenne des jours (écart)	66 (58-75) <sup>b</sup>	115 (98-133) <sup>b</sup>	120 (84-162) <sup>c</sup>	89 (62-125) <sup>b</sup>	129 (84-173) <sup>c</sup>	149 (96-170) <sup>c</sup>
Cultures d'organes positifs pour <i>C. gattii</i>						
Cerveau						
Nb de souris	1	5	1	5	1	5
Décompte <i>C. gattii</i> cfu/g	5.9x10 <sup>3</sup>	2.4x10 <sup>4</sup>	6.4x10 <sup>6</sup>	9.6x10 <sup>4</sup>	NA	5.9x10 <sup>7</sup>
Écart	NA	5.6x10 <sup>3</sup> - 4.2x10 <sup>4</sup>	NA	1.8x10 <sup>4</sup> - 2.4x10 <sup>5</sup>	NA	1.2x10 <sup>7</sup> - 1.7x10 <sup>8</sup>
Poumons						
Nb de souris	8	9	6	8	6	8
Décompte <i>C. gattii</i> cfu/g	7.2x10 <sup>7</sup>	5.9x10 <sup>7</sup>	3.8x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>	4.9x10 <sup>7</sup>	1.5x10 <sup>7</sup>
Écart	5.0x10 <sup>7</sup> - 1.1x10 <sup>8</sup>	2.1x10 <sup>7</sup> - 1.5x10 <sup>8</sup>	1.7x10 <sup>7</sup> - 6.2x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>8</sup> - 3.5x10 <sup>8</sup>	8.3x10 <sup>6</sup> - 1.7x10 <sup>8</sup>	3.6x10 <sup>6</sup> - 3.4x10 <sup>7</sup>
Foie						
Nb de souris	1	3	3	2	1	3
Décompte <i>C. gattii</i> cfu/g	1.9x10 <sup>4</sup>	1.2x10 <sup>5</sup>	7.7x10 <sup>4</sup>	2.7x10 <sup>4</sup>	8.7x10 <sup>5</sup>	1.3x10 <sup>4</sup>
Écart	NA	4.6x10 <sup>3</sup> - 2.5x10 <sup>5</sup>	3.9x10 <sup>3</sup> - 2.0x10 <sup>5</sup>	2.1x10 <sup>4</sup> - 3.2x10 <sup>4</sup>	NA	1.2x10 <sup>3</sup> - 2.1x10 <sup>4</sup>
Rate						
Nb de souris	0	0	0	0	0	0
Décompte <i>C. gattii</i> cfu/g	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Écart	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA, non applicable

<sup>a</sup> souris étudiées incluent des Tg et contrôles non-Tg provenant de la souris fondatrice F21388<sup>b</sup> évaluation le jour de l'euthanasie en raison de l'atteinte des points limite (maladie)<sup>c</sup> évaluation le jour de l'euthanasie en raison de l'atteinte des points limite (maladie); les souris survivantes ont été euthanasiées 110 jours après l'inoculation avec *C. gattii*



Il est intéressant de noter l'absence ou la faible dissémination de *C. neoformans* C23 chez les souris non-Tg aux deux inocula les plus faibles (Tableau IV) comparativement à *C. neoformans* H99 (Tableau III), concordant avec la virulence réduite de *C. neoformans* C23 comparativement à H99 déjà notée dans l'étude de survie (Figure 6). En effet, aucune souris non-Tg infectée au *C. neoformans* C23 n'a eu de résultats de CFU positifs à l'inoculum le plus faible et seulement deux ont eu un CFU positif à l'inoculum intermédiaire (Tableau IV).

Comparativement à *C. neoformans*, *C. gattii* a présenté une dissémination minimale vers la rate et faible vers le foie et le cerveau (Tableaux V-VI). De plus, le nombre de souris infectées est moins élevé comparativement aux souris infectées au *C. neoformans*.

Chez les souris non-Tg, les CFUs de la rate et du foie étaient plus grandes plus l'inoculum est élevé pour les deux souches de *C. neoformans* ( $p \leq 0.001$ ). De plus, les CFUs étaient comparables pour les deux souches. Cet effet n'a pas été observé chez les souris Tg, autant en fonction de l'inoculum que de la souche inoculée. L'augmentation de la mortalité chez les souris Tg infectées au *C. neoformans* H99 et C23, comparativement aux non-Tg, était en corrélation avec une augmentation de la dissémination au foie et à la rate aux deux inocula les plus faibles de ces deux mêmes souches ( $p < 0.03$ ) (Tableaux III et IV). Cet effet de l'expression du transgène VIH-1 n'était pas observé chez les souris infectées au *C. gattii* (Tableaux V et VI). Par contre, un effet du transgène sur la dissémination vers le cerveau n'a été observé que chez les souris infectées aux deux plus faibles inocula de *C. neoformans* C23 ( $p \leq 0.002$ ), et non pas au *C. neoformans* H99 ou *C. gattii*.

Il faut donc noter que *C. neoformans* est plus virulent que *C. gattii*, tant au niveau de la survie que la dissémination vers les organes profonds.

### Histopathologie

Puisque nous avons pu établir des différences entre les souris Tg et non-Tg au niveau de la survie de celles-ci lors de l'infection au *C. neoformans* ou au *C. gattii*, il était donc intéressant et essentiel d'étudier la pathologie de l'infection au niveau des poumons et du cerveau, premier organe infecté et organe pour lequel la levure a un tropisme respectivement. Nous avons donc préparé ces deux organes pour des études d'histopathologie. Six souris Tg et six souris non-Tg ont été infectées par la voie intra-nasale avec  $1.25 \times 10^4$  CFU de la souche H99 ou  $1.25 \times 10^5$  CFU de la souche R265. Ces inocula ont été sélectionnés puisque ceux-ci ont produit les plus grands écarts de mortalité entre les souris Tg et non-Tg (Figure 6). L'histopathologie des poumons et les décomptes des CFUs ont été étudiés aux temps fixes de 7 et 14 jours après l'infection. Les résultats des CFUs sont présentés aux tableaux VII et VIII.

Tableau VII. Unités formatrices de colonies (CFUs) dans les organes de souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV<sup>Muta</sup> inoculées par voie intra-nasale avec  $1.25 \times 10^4$  CFU de *Cryptococcus neoformans* souche H99

Variable	Souris <sup>a</sup>			
	Tg		Contrôle Non-Tg	
Nb de jours après l'inoculation	7	14	7	14
Nb inoculé	6	6	6	6
Cultures d'organes positifs pour <i>C. neoformans</i>				
Cerveau				
Nb de souris	0	4	0	2
Décompte <i>C. neoformans</i> cfu/g	NA	$2.5 \times 10^6$	NA	$6.9 \times 10^6$
Écart	NA	$4.4 \times 10^4 - 8.5 \times 10^6$	NA	$3.8 \times 10^5 - 1.4 \times 10^7$
Poumons				
Nb de souris	6	6	6	6
Décompte <i>C. neoformans</i> cfu/g	$1.1 \times 10^8$	$6.1 \times 10^8$	$6.7 \times 10^7$	$2.0 \times 10^8$
Écart	$3.3 \times 10^7 - 3.9 \times 10^8$	$4.6 \times 10^7 - 1.1 \times 10^9$	$3.6 \times 10^7 - 1.0 \times 10^8$	$1.0 \times 10^8 - 3.1 \times 10^8$
Foie				
Nb de souris	0	4	2	1
Décompte <i>C. neoformans</i> cfu/g	NA	$4.1 \times 10^4$	$9.6 \times 10^3$	$6.5 \times 10^3$
Écart	NA	$2.3 \times 10^4 - 5.8 \times 10^4$	$7.9 \times 10^3 - 1.1 \times 10^4$	NA
Rate				
Nb de souris	0	4	0	1
Décompte <i>C. neoformans</i> cfu/g	NA	$2.7 \times 10^5$	NA	$1.8 \times 10^4$
Écart	NA	$1.6 \times 10^7 - 4.2 \times 10^5$	NA	NA

NA, non applicable

<sup>a</sup>souris étudiées incluent des Tg et contrôles non-Tg provenant de la souris fondatrice F21388

Tableau VIII. Unités formatrices de colonies (CFUs) dans les organes de souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV<sup>Muta</sup> inoculées par voie intra-nasale avec  $1.25 \times 10^5$  CFU de *Cryptococcus gattii* souche R265

Variable	Souris <sup>a</sup>			
	Tg		Contrôle Non-Tg	
Nb de jours après l'inoculation	7	14	7	14
Nb inoculé	6	6	6	6
Cultures d'organes positifs pour <i>C. gattii</i>				
Cerveau				
Nb de souris	0	1	4	0
Décompte <i>C. gattii</i> cfu/g	NA	$3.5 \times 10^5$	$2.4 \times 10^4$	NA
Écart	NA	NA	$1.3 \times 10^4 - 5.9 \times 10^4$	NA
Poumons				
Nb de souris	6	6	6	6
Décompte <i>C. gattii</i> cfu/g	$1.7 \times 10^8$	$1.9 \times 10^8$	$1.6 \times 10^8$	$2.5 \times 10^8$
Écart	$3.9 \times 10^7 - 2.4 \times 10^8$	$1.0 \times 10^8 - 3.6 \times 10^8$	$4.0 \times 10^7 - 2.6 \times 10^8$	$1.8 \times 10^8 - 3.3 \times 10^8$
Foie				
Nb de souris	0	2	1	1
Décompte <i>C. gattii</i> cfu/g	NA	$6.0 \times 10^3$	$3.7 \times 10^3$	$5.7 \times 10^4$
Écart	NA	$4.2 \times 10^3 - 7.8 \times 10^3$	NA	NA
Rate				
Nb de souris	0	0	0	0
Décompte <i>C. gattii</i> cfu/g	NA	NA	NA	NA
Écart	NA	NA	NA	NA

NA, non applicable

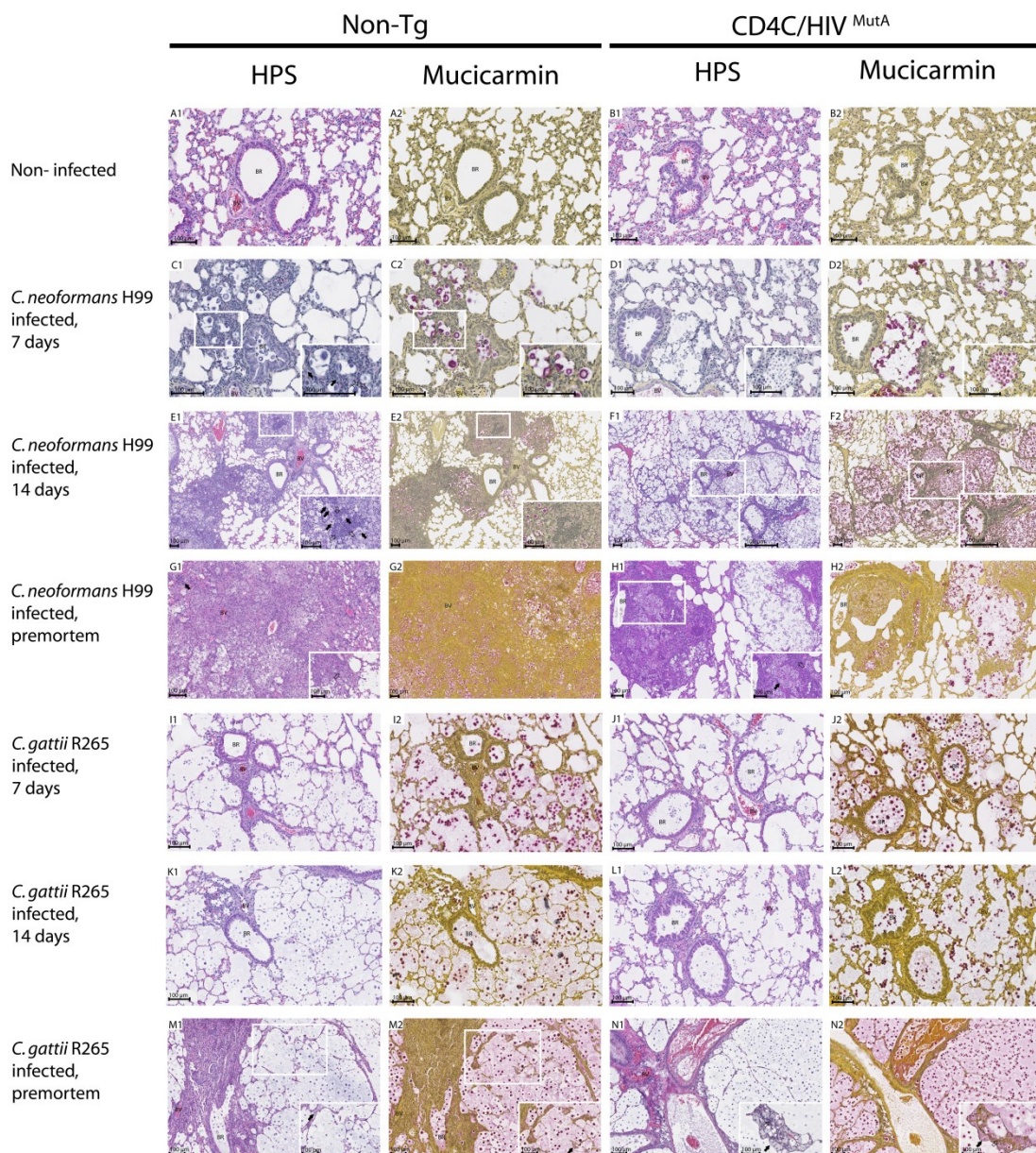
<sup>a</sup>souris étudiées incluent des Tg et contrôles non-Tg provenant de la souris fondatrice F21388

La dissémination systémique était très faible à 7 jours vs 14 jours chez *C. neoformans* H99 (Tableau VII) et très faible à ces deux jours chez *C. gattii* R265 (Tableau VIII). En effet, à 7 jours pour *C. neoformans*, seules 2 souris non-Tg ont été infectées aux organes profonds, et ce, seulement au foie (Tableau VII). Pour *C. gattii*, aucune souris n'a été infectée à la rate, seulement 2 Tg et une Tg et non-Tg ont été infectées au foie, et 1 Tg et 4 non-Tg ont été infectées au cerveau (Tableau VIII).

À 14 jours, la fréquence de la dissémination au foie et à la rate ainsi que les CFUs étaient plus élevés chez les souris Tg comparativement aux non-Tg infectées à l'inoculum le plus faible de *C. neoformans* H99 ( $1.25 \times 10^4$  CFU) ( $p < 0.05$ ). À 7 jours, il n'y avait pas encore de dissémination et les CFUs des poumons étaient plus faibles qu'au jour 14, sans différence entre les souris Tg et non-Tg ( $p > 0.05$ ), suggérant que la réponse innée à l'égard de *C. neoformans* est intacte au début de l'infection. Par contre, les CFUs des poumons chez les souris infectées au *C. gattii* R265 étaient comparables à 7 et 14 jours ( $p > 0.05$ ), et la dissémination systémique était faible et comparable chez les souris Tg et non-Tg à 14 jours ( $p > 0.05$ ).

La dissémination, bien que déjà présente, s'effectue donc à un rythme plus lent pour arriver à des CFUs aussi élevés que ceux obtenus dans les tableaux III à VI.

L'examen histopathologique des poumons et des cerveaux a aussi été effectué afin d'apprécier la nature, la localisation et l'étendue de la réponse inflammatoire envers *C. neoformans* H99 et *C. gattii* R265. Les résultats de ces colorations pour chaque souche, et temps d'incubation sont présentés à la figure 7.



**Figure 7. Histopathologie des poumons de souris transgéniques et non-transgéniques infectées par *C. neoformans* H99 ou *C. gattii* R265, à 7 et 14 jours après l'infection et en pré-mortem.** Pour chaque souche, 6 souris Tg et non-Tg ont été inoculées par voie intra-nasale (inoculum : H99,  $1.25 \times 10^4$ ; R265,  $1.25 \times 10^5$ ) et ont été euthanasiées à 7 ou 14 jours. Les tissus pulmonaires ont été colorés au HPS et à la mucicarmin. Il est important de noter la présence d'une réponse inflammatoire chez les non-Tg (C,E,G), comparativement aux Tg (D,F,H), chez les souris infectées au *C. neoformans*. Il y a quasi-absence d'une réponse inflammatoire chez les souris infectées au *C. gattii* (I à N).

Il est tout d'abord possible de constater que la réponse inflammatoire dans les poumons est très différente entre les souris Tg et non-Tg infectées au *C. neoformans*

H99. À 7 jours chez les souris Tg, un bon nombre de levures est localisé soit dans les bronchioles ou dans le parenchyme, où elles sont dispersées ou forment des kystes, le tout accompagné d'une infiltration minimale de cellules mononucléées (Figure 7, D1 et D2). À 14 jours, le nombre de levures augmente considérablement et la dispersion s'étend dans tout le poumon. Il n'y a pratiquement pas de réponse inflammatoire sauf quelques rares infiltrations de PMNs et de monocytes dans les espaces broncho-vasculaires (Figure 7, F1 et F2). Chez les souris non-Tg, la situation est bien différente. À 7 jours, des infiltrations broncho-vasculaires très denses contenant des monocytes et des PMNs englobent totalement les levures (Figure 7, C1 et C2). À 14 jours, les levures sont presque totalement englobées dans des infiltrations beaucoup plus étendues de PMNs et de macrophages (Figure 7, E1 et E2). En pré-mortem, chez les souris non-Tg, la réponse inflammatoire est très étendue et il y a apparition de granulomes nécrosants contenant des cellules épithélioïdes ainsi que des cellules géantes de type Langhans (Figure 7, G1 et G2). Les souris Tg, en pré-mortem, présentent quant à elles une faible réponse inflammatoire caractérisée par la présence de macrophages et de PMNs, sans toutefois contenir de granulomes. De plus, il faut noter la présence de levures sans réponse inflammatoire dans de grandes étendues du parenchyme pulmonaire (Figure 7, H1 et H2).

Pour ce qui est de *C. gattii*, autant chez les souris Tg que non-Tg, les levures sont très dispersées dans le parenchyme pulmonaire et la réponse inflammatoire, à 7 et 14 jours, est minime (Figure 7, I à L). En pré-mortem, une réponse inflammatoire modeste et circonscrite composée de macrophages et de PMNs a pu être observée tant chez les souris Tg que non-Tg (Figure 7, M à N).

Pour ce qui est du cerveau, à 7 jours après l'infection au *C. neoformans* chez les deux types de souris, l'examen histopathologique n'a révélé aucune évidence du champignon, ce qui concorde avec l'absence de dissémination vers cet organe à ce temps précoce après l'infection (Tableau VII). À 14 jours, l'histopathologie du cerveau a révélé la présence de levures chez une seule souris non-Tg infectée au *C. neoformans*. Aucune évidence histopathologique de *C. gattii* n'a été démontrée dans les cerveaux de souris infectées.

Il est donc important de noter l'absence à très faible réponse inflammatoire chez les souris infectées au *C. gattii*. Pour ce qui est de *C. neoformans*, une différence de transgène a pu être établie. La réponse chez les souris non-Tg est forte et fonctionnelle, tandis que chez les souris Tg, la réponse est présente, mais semble être retardée.

Lors de l'observation des lames, nous avons noté la présence de levures géantes. Puisque plusieurs chercheurs ont aussi noté cette caractéristique lors de leurs expériences (voir introduction), il était donc important de tenir compte de ce phénomène. À partir des lames colorées à la mucicarminé (coloration des capsules), nous avons mesuré les diamètres de 100 levures ainsi que l'épaisseur de leur capsule, sélectionnées aléatoirement (Tableau IX).

Tableau IX. Diamètre des corps cellulaires et épaisseur de la capsule de *C. neoformans* H99 and *C. gattii* R265 sur des coupes de tissu pulmonaire colorées à la mucicarminé 7 ou 14 jours après l'infection de souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> ou non-Tg

Mesure et souche	Type de souris et nb de jours après l'infection			
	Tg		Non-Tg	
	7	14	7	14
<b>Diamètre du corps cellulaire (µm)</b>				
<i>C. neoformans</i> H99	11.8 ± 4.2 <sup>a,b</sup>	11.4 ± 4.5 <sup>b</sup>	12.4 ± 3.6 <sup>b</sup>	15.4 ± 3.5 <sup>b,c,d</sup>
<i>C. gattii</i> R265	10.3 ± 2.8	9.8 ± 2.7	9.5 ± 2.9	12.0 ± 2.8 <sup>c,d</sup>
<b>Épaisseur de la capsule (µm)</b>				
<i>C. neoformans</i> H99	5.0 ± 1.9 <sup>b</sup>	5.6 ± 2.5 <sup>b</sup>	6.3 ± 1.8 <sup>b</sup>	8.2 ± 2.0 <sup>b,c,d</sup>
<i>C. gattii</i> R265	4.9 ± 1.4	4.7 ± 2.3	3.5 ± 1.3	6.2 ± 2.0 <sup>c,d</sup>

<sup>a</sup> Les données proviennent de la moyenne ± SD de 100 cellules sélectionnées au hasard

<sup>b</sup> p < 0.001 comparé à *C. gattii* R265

<sup>c</sup> p < 0.001 comparé aux souris non-Tg au jour 7

<sup>d</sup> p < 0.001 comparé aux souris Tg au jour 14

Pour les deux espèces de *Cryptococcus*, les diamètres de la levure ainsi que l'épaisseur de la capsule augmentent entre les jours 7 et 14 chez les souris non-Tg

( $p < 0.001$ ), mais pas chez les souris Tg ( $p > 0.05$ ). À 14 jours, pour les deux espèces de *Cryptococcus*, ces deux mesures sont significativement plus grandes chez les souris non-Tg comparativement aux souris Tg ( $p < 0.001$ ). Cependant, tant le diamètre cellulaire que l'épaisseur de la capsule diffèrent chez *C. neoformans* et *C. gattii*. En effet, le diamètre du corps cellulaire et l'épaisseur de la capsule de *C. neoformans* H99 sont systématiquement supérieurs à ceux de *C. gattii* R265, autant à 7 jours qu'à 14 jours après l'infection, et ce indépendamment de l'expression du transgène VIH-1 ( $p < 0.001$ ). Il est aussi intéressant de noter la présence de levures géantes dans les poumons de souris Tg et non-Tg infectées au *C. neoformans* H99, mais pas au *C. gattii* R265 (Figure 7) (Feldmesser, Kress et al. 2001).

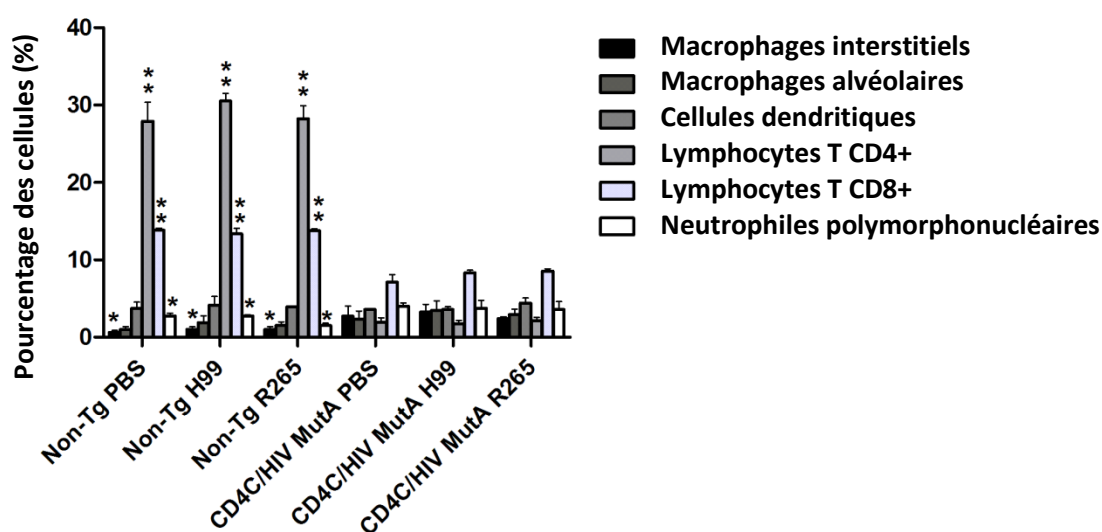
Ce qu'il faut retenir de ces résultats est que chez les non-Tg, le diamètre et l'épaisseur de la capsule des levures augmente avec le temps, que les levures sont plus grandes en moyenne que les levures chez les souris Tg, et que les levures *C. neoformans* H99 sont plus grandes que les levures *C. gattii* R265. Enfin, nous n'avons pas retrouvé de levures dites géantes chez les souris infectées au *C. gattii* R265.

### Quantification des populations de cellules immunitaires pulmonaires

Puisque nous avons pu établir des différences au niveau de la réponse immunitaire des Tg et non-Tg infectées au *C. neoformans* H99 ou au *C. gattii* lors de l'expérience d'histopathologie, il était essentiel d'étudier plus en détail la réponse immunitaire par la mesure des populations cellulaires présentes lors de l'infection au poumon. Nous avons quantifié les populations cellulaires dans les poumons 7 jours après l'infection. Il y avait six groupes de souris à l'étude : Tg et non-Tg témoins PBS, Tg et non-Tg infectées au *C. neoformans* H99, Tg et non-Tg infectées au *C. gattii* R265. Les cellules immunitaires sont tout d'abord sélectionnées par la présence du marqueur CD45<sup>+</sup>. Les cellules CD45<sup>+</sup> sont par la suite sélectionnées pour différents marqueurs qui les différencient entre elles : cellules dendritiques (CD45<sup>+</sup>, CD11b<sup>hi</sup>, CD11c<sup>hi</sup>), macrophages interstitiels (CD45<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD11c<sup>-</sup>, F4/80<sup>+</sup>), macrophages



alvéolaires ( $CD45^+$ ,  $CD11b^+$ ,  $CD11c^{hi}$ ,  $F4/80^{low}$ ), PMNs ( $CD45^+$ ,  $CD3^-$ ,  $Gr-1^+$ ), lymphocytes T  $CD4^+$  ( $CD45^+$ ,  $CD4^+$ ,  $CD8^-$ ), lymphocytes T  $CD8^+$  ( $CD45^+$ ,  $CD4^-$ ,  $CD8^+$ ). La quantification est donc une mesure du pourcentage de ces cellules dans la population totale de cellules  $CD45^+$ . Grâce à cette technique, nous avons pu déterminer s'il y avait une variation dans les populations cellulaires des poumons en fonction de la présence ou de l'absence du transgène, et de l'infection ou non au *C. neoformans* ou *C. gattii*.

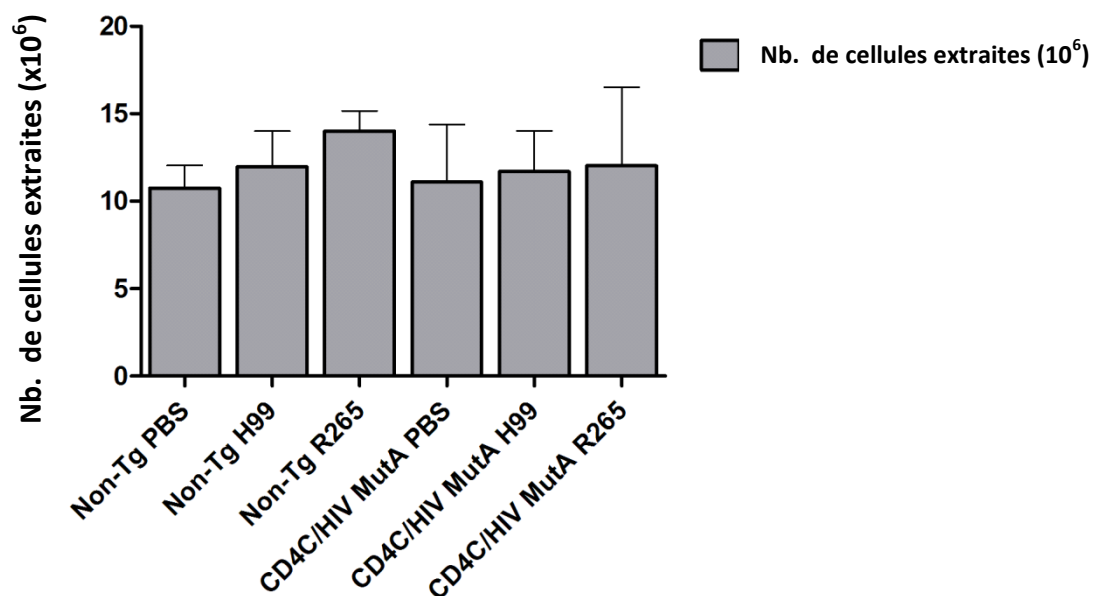


**Figure 8.** Pourcentage de cellules immunitaires pulmonaires quantifiées par cytométrie en flux, 7 jours après l'infection de souris transgéniques et non-transgéniques non-infectées, ou infectées au *C. neoformans* H99 ou au *C. gattii* R265. Pour chaque expérience, 6 souris Tg et non-Tg ont été infectées par voie intra-nasale au PBS, *C. neoformans* H99, ou *C. gattii* R265 (inoculum : H99,  $1.25 \times 10^4$  ; R265,  $1.25 \times 10^5$ ). Après 7 jours, les poumons sont digérés avec de la collagénase et analysés pour les populations pulmonaires données. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes.\* indique une différence significative ( $p < 0.05$ ) du % de la population cellulaire entre les souris Tg vs non-Tg infectées avec le même inoculum de la même souche, \*\* indique une différence significative ( $p < 0.01$ ) du % de la population cellulaire entre les souris Tg vs non-Tg infectées avec le même inoculum de la même souche. Statistiques : Analyse de variance (SPSS ver. 19)

La figure 8 présente les résultats du pourcentage de chaque population de cellules pulmonaires, selon le transgène et la souche. On constate tout d'abord une diminution importante du pourcentage de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et T CD8<sup>+</sup> chez les souris Tg comparativement aux souris non-Tg, peu importe la présence ou l'absence d'infection au *Cryptococcus* et de l'espèce en cause ( $p < 0.001$ ). De plus, il faut noter une inversion du ratio T CD4<sup>+</sup> / T CD8<sup>+</sup> chez les souris Tg. Par ailleurs, le pourcentage de macrophages interstitiels et des PMNs recrutés est plus élevé chez les souris Tg ( $p < 0.02$ ), et les macrophages alvéolaires présentent la même tendance ( $p = 0.08$ ). Nous n'avons pas obtenu de différence significative en ce qui concerne le pourcentage des cellules dendritiques ( $p > 0.05$ ).

L'infection au *C. neoformans* et au *C. gattii* n'a causé en soi aucune différence significative du pourcentage des populations cellulaires.

Globalement, ces résultats démontrent que l'expression du transgène VIH-1 réduit, de façon indépendante de l'infection au *C. neoformans* ou *C. gattii*, le pourcentage de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et CD8<sup>+</sup>, et augmente le pourcentage de macrophages interstitiels et de PMNs.



**Figure 9. Nombre total de cellules pulmonaires extraites après 7 jours chez des souris transgéniques et non-transgéniques non-infectées, ou infectées au *C. neoformans* H99 ou au *C. gattii* R265.** Pour chaque expérience, 6 souris Tg et non-Tg ont été infectées par voie intra-nasale au PBS, *C. neoformans* H99, ou *C. gattii* R265 (inoculum : H99,  $1.25 \times 10^4$  ; R265,  $1.25 \times 10^5$ ). Après 7 jours, les poumons sont digérés avec de la collagénase, les globules rouges sont lysés et le nombre total de cellules du poumon extraites est dénombré à l'hématimètre. Les résultats représentent la moyenne  $\pm$  SD de trois expériences indépendantes. Statistiques : Analyse de variance (SPSS ver. 19).

La figure 9 présente les résultats du nombre de cellules extraites par souche et par transgène. Après broyage des poumons et lyse des globules rouges, les cellules sont comptées à l'hématimètre et un estimé du nombre de cellules extraites est calculé. Il n'y a pas de différence significative au niveau de la souche ou du transgène ( $p > 0.05$ ).

## CHAPITRE 6 : DISCUSSION

La souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup>, exprimant les gènes nef, rev et env du VIH-1 présente une maladie apparentée au SIDA, ce qui cause la déplétion des lymphocytes T CD4+, l'atrophie et la fibrose des organes lymphoïdes et entraîne prématurément la mort. Les effets du transgène sont similaires aux atteintes observées chez les patients atteints du VIH-1, ce qui fait de cette souris un modèle idéal pour étudier la cryptococcose (Hanna, Kay et al. 1998). Comme chez les individus atteints du SIDA, les souris Tg permettent l'établissement de l'infection par *Cryptococcus*.

*C. neoformans* H99 est une souche virulente, et représentative des souches de *C. neoformans* var. *grubii* (sérotypage A), responsables de la vaste majorité (99%) des infections chez les patients atteints du SIDA (Idnurm, Bahn et al. 2005). Les souris Tg sont toutes décédées de l'infection par H99 (Figure 6). La majorité des patients sidéens infectés au *C. neoformans* var. *grubii* décède aussi à la suite de cette infection, ce qui démontre bien la pertinence du modèle transgénique VIH-1 de la cryptococcose. En effet, les analyses de survie indiquent que lorsque le transgène est présent, la susceptibilité à la cryptococcose est considérablement augmentée, similairement aux patients humains atteints du VIH-1. En général, les personnes immunocompétentes ne sont pas infectées par le *C. neoformans* var. *grubii*, mais c'est possible dans de rares cas (Idnurm, Bahn et al. 2005). D'ailleurs, l'infection au *C. neoformans* H99 s'est aussi établie chez les souris non-Tg. Puisque cette souche est virulente et que les inocula injectés aux souris par la voie intra-nasale sont assez élevés, l'infection s'est également établie chez les souris non-Tg. De ce fait, la dissémination de la souche H99 vers la rate, le foie et le cerveau se produit chez presque toutes les souris, Tg ou non, à l'inoculum supérieur de  $1.25 \times 10^6$  CFU (Tableau III). Toutefois, cet inoculum élevé n'est pas nécessairement représentatif de la charge de *Cryptococcus* à laquelle l'homme est exposé dans la nature, puisque les levures sont le plus souvent éliminées ou restent en dormance (Bovers, Hagen et al. 2008). Par ailleurs, contrairement aux souris Tg, les deux plus faibles inocula de *C. neoformans* H99 n'entraînent pas la mort de toutes les souris non-Tg, ce qui indique que leur système immunitaire intact joue un rôle protecteur contre l'infection. Ces

résultats concordent avec la situation chez l'homme sain, puisque presque tous les humains possèdent des anticorps contre *Cryptococcus*, résultant d'une exposition initiale, et qui protègent contre l'infection (Kronstad, Attarian et al. 2011). Les humains sains survivent donc souvent à l'infection. Enfin, la susceptibilité accrue des souris Tg à l'infection par H99, comparativement aux souris non-Tg, reproduit de façon fidèle la susceptibilité des patients sidéens à la cryptococcose.

Pour ce qui est du *C. neoformans* C23, la majorité des souris Tg meurt alors que la majorité des non-Tg survit aux plus faibles inocula. La souche C23 a été isolée d'un lavage broncho-alvéolaire chez un patient immunodéprimé (corticostéroïdes) receveur de greffe pulmonaire (Litvintseva and Mitchell 2009). Cette souche provoque donc une infection dans des conditions où le système immunitaire est affaibli, ce qui cadre bien avec les résultats observés chez les souris Tg. À l'instar de l'infection chez ce patient (Litvintseva and Mitchell 2009), il y a aussi eu dissémination vers le cerveau chez la souris Tg (Tableau IV). Au plus faible inoculum ( $1.25 \times 10^4$  CFU), il n'y a pas de dissémination systémique chez les souris non-Tg (Tableau IV), alors que C23 dissémine efficacement chez les souris Tg. Même si l'inoculum le plus élevé ( $1.25 \times 10^6$  CFU) cause la mort tant chez les souris Tg que non-Tg, C23 entraîne presque aucune mortalité des souris non-Tg aux deux plus faibles inocula (Figure 6). La souche de *C. neoformans* C23 est moins virulente que la souche H99, mais tout comme la souche H99, elle cause la mortalité des souris Tg et ce, même à de faibles inocula.

Les résultats de l'analyse de survie des souris infectées au *C. gattii* diffèrent des résultats obtenus suite à l'infection au *C. neoformans* (Figure 6). Aux inocula le plus faible et le plus élevé de la souche R265, il n'y a pas de différence significative de survie entre les souris Tg et les non-Tg (Figure 6). Ces inocula sont donc trop faibles ou trop élevés pour révéler une augmentation de la susceptibilité causée par l'expression du transgène VIH-1. Cependant, à l'inoculum intermédiaire de la souche R265, la mortalité des souris Tg est significativement augmentée comparativement aux souris non-Tg. Le même phénomène est observé chez la souche R272 à l'inoculum le plus élevé, où il y a une différence significative de survie entre les

souris Tg et les non-Tg, mais pas aux autres inocula (Figure 6). On peut donc conclure que contrairement au *C. neoformans*, chez qui l'expression du transgène VIH-1 augmente la susceptibilité indépendamment de l'inoculum, l'infection au *C. gattii* est facilitée chez les souris Tg à un seul inoculum qui est par ailleurs relativement élevé. La mortalité est plus lente chez la souche R272 comparativement à la souche R265 de *C. gattii* (Figure 6). R265 est donc plus virulente que R272. La souche R272 de *C. gattii* appartient au type moléculaire VGIIb, dont le génome diffère légèrement de R265 (VGIIa). Bien que les génomes de ces deux types moléculaires soient identiques à 98%, la légère variation de génotype (R265 : AFLP6A, R272 : AFLP6B) est probablement responsable de la variation du taux de survie ainsi que la progression de la maladie (Litvintseva and Mitchell 2009; Ngamskulrunroj, Serena et al. 2011). Puisque le type moléculaire VGIIa est connu comme plus virulent que le type VGIIb (Ngamskulrunroj, Serena et al. 2011), les résultats actuels confirment cette différence chez la lignée de souris C3H. Par contre, chez l'homme, ces deux souches de *C. gattii* ont causé des infections très similaires sur l'Île de Vancouver et il n'y avait pas de différences majeures au niveau de la production des facteurs de virulence ou de la réponse immunitaire contre ces dernières (Cheng, Sham et al. 2009). Il est donc très possible qu'un ou plusieurs facteurs de virulence encore non identifiés soient responsables de la différence de virulence entre les souches R265 et R272 de *C. gattii* dans notre modèle murin. De plus, l'extrapolation des résultats de modèles murins vers l'homme n'est jamais exacte vu la différence entre les deux espèces animales.

Les souches de *C. gattii* n'entraînent pas la mort des souris aussi rapidement que les souches de *C. neoformans* (Figure 6). En effet, la mortalité survient beaucoup plus tardivement chez les souris infectées au *C. gattii*. De plus, la dissémination vers d'autres organes est plus faible chez *C. gattii* comparativement à *C. neoformans* (Tableaux III-VI). Ceci indique que *C. neoformans* est plus virulent que *C. gattii*. Une cause possible serait une réponse inflammatoire démesurée et excessive dans les poumons infectés au *C. neoformans* (Cheng, Sham et al. 2009). La plupart des souris infectées au *C. neoformans* H99, ayant atteint les points limites pour l'euthanasie, souffraient de détresse respiratoire, car les poumons étaient surchargés en levures et

cellules immunitaires. Une surcharge inflammatoire entraîne souvent une destruction des tissus et est donc nuisible à l'hôte (Nathan and Ding 2010). Tel que mentionné dans l'introduction, la moyenne de survie des patients sidéens infectés par le *C. neoformans* H99 est de trois mois (en raison de la dissémination vers le cerveau), tandis que la plupart des patients infectés au *C. gattii* sont sains et guérissent après traitement. Les résultats de la figure 6 et des tableaux III à VI démontrent cette tendance. *C. neoformans* infecte des patients immunodéficients et il est donc prévisible que leur survie soit moindre comparativement aux patients immunocompétents infectés par *C. gattii*. Puisque ces courbes de survie ne donnent pas d'informations sur la réponse inflammatoire contre *Cryptococcus*, des analyses d'histopathologie et de cytométrie en flux ont été effectuées.

Fait intéressant, la survie des souris, selon leur sexe, varie en fonction de l'inoculum ( $p < 0.02$ ) (Figures supplémentaires, S1-S4). En effet, aux deux inocula les plus élevés, les mâles meurent plus rapidement comparativement aux femelles. Par contre, tous les groupes d'études ne contenaient pas une quantité égale de mâles et de femelles, le choix des souris étant aléatoire et selon la disponibilité (93 mâles pour 147 femelles pour cette expérience). Néanmoins, une différence significative a pu être démontrée et un lien peut être établi chez l'humain, puisque les hommes semblent plus affectés que les femmes par les infections au *Cryptococcus* (voir introduction, section manifestations cliniques).

Des coupes histopathologiques de poumons et de cerveau (pour étudier le tropisme de *Cryptococcus*) ont été effectuées et colorées afin de permettre l'évaluation de la réponse inflammatoire à 7 et 14 jours pour *C. neoformans* H99, qui infecte les patients sidéens, et *C. gattii* R265, responsable de la majeure partie des infections en Colombie-Britannique. Des coupes provenant d'animaux en pré-mortem (atteinte des points limites tel que définis par le CDEA) ont aussi été examinées, afin de comparer la phase tardive de l'infection aux observations de 7 et 14 jours. En comparaison avec les souris non-infectées, une réponse inflammatoire composée de PMNs et de cellules mononucléées est déjà présente chez les souris non-Tg 7 jours après l'infection au *C. neoformans* H99. Puisque peu de levures sont libres dans le tissu pulmonaire, la

réponse immunitaire innée, primordiale à ce stade précoce de l'infection, est intacte et fonctionnelle contre *C. neoformans* H99. La présence de granulomes pulmonaires chez les souris non-Tg en pré-mortem témoigne de la présence de l'immunité adaptative au stade plus avancé de l'infection. La présence de granulomes est d'ailleurs observée chez les patients immunocompétents infectés au *C. neoformans*, alors qu'ils sont absents chez les individus immunodéprimés (Shibuya, Hirata et al. 2005). Les résultats histopathologiques (Figure 7, C-H) concordent avec les manifestations cliniques chez les souris non-Tg infectées au *C. neoformans*. En pré-mortem, l'inflammation est tellement étendue qu'il n'y a presque plus d'espaces alvéolaires dans les poumons (Figure 7 G). L'inflammation pulmonaire excessive pourrait donc contribuer à la mortalité accélérée des souris non-Tg infectées au *C. neoformans*. Cependant, il faut bien noter que la mortalité suite à l'infection au *C. neoformans* est accélérée chez les souris Tg qui produisent peu ou pas de réponse inflammatoire, indiquant que non seulement une réponse inflammatoire excessive, mais aussi une réponse déficiente peuvent contribuer à la mortalité. En effet, chez les souris Tg, il y a très peu de réponse inflammatoire à 7 jours (Figure 7 D). La présence de cryptococcomes, qui représentent des amas de levures sans réponse inflammatoire, est observée. Cela indique que les souris Tg ont une incapacité à produire une réponse immunitaire efficace contre H99 comparativement aux souris non-Tg. Comme chez les patients séropositifs, les déficiences immunitaires causées par l'expression du transgène VIH-1 augmentent la susceptibilité aux infections fongiques, dont la cryptococcose (Durden and Elewski 1997). À 14 jours, les souris Tg produisent une faible réponse inflammatoire contre H99 (Figure 7 F), démontrant une profonde déficience dans l'induction de cette réponse. En pré-mortem (Figure 7 H), chez les souris Tg, la réponse inflammatoire est plus étendue qu'à 14 jours (Figure 7 F), mais il y a quand même un grand nombre de levures libres et de cryptococcomes dans le tissu pulmonaire. La réponse inflammatoire au *C. neoformans* H99 est donc retardée et considérablement réduite chez les souris Tg VIH-1 comparativement à celle des souris non-Tg.

L'examen histopathologique des poumons de souris infectées au *C. gattii* R265 est nettement différent de *C. neoformans* H99 (Figure 7 I-N). En effet, autant chez les



souris Tg que non-Tg à 7 jours et à 14 jours, la réponse inflammatoire est minime ou même absente. Par ailleurs, il a été démontré que *C. gattii* induit une réponse inflammatoire plus faible que celle de *C. neoformans* chez la souris C57BL/6 (Cheng, Sham et al. 2009). La présence de cryptococcomes comportant une faible réponse inflammatoire est aussi retrouvée chez l'homme infecté au *C. gattii*, ce qui concorde avec les observations chez les souris infectées à la souche R265 (Severo, Gazzoni et al. 2009). En pré-mortem, on note la présence d'une réponse inflammatoire modeste composée surtout de macrophages et de PMNs, mais celle-ci demeure minime comparativement à celle induite par *C. neoformans* H99. *C. gattii* induit donc une faible réponse inflammatoire peu importe l'expression ou non du transgène VIH-1. Ceci indique que R265 est capable d'éviter, du moins en partie, la réponse immunitaire de l'hôte. Ces résultats corrélerent avec les observations chez l'homme. Deux équipes de chercheurs ont démontré que R265 induit une plus faible réponse immunitaire par sa capacité à inhiber la migration des neutrophiles humains (Dong and Murphy 1995; Wright, Bubb et al. 2002). Puisque R265 peut échapper à la réponse immunitaire chez les souris immunocompétentes, il est donc logique que la majorité des patients infectés au *C. gattii* sur l'Île de Vancouver soient immunocompétents. Puisque notre modèle d'infection et les résultats histopathologiques pour *C. gattii* ressemblent aux manifestations cliniques humaines, il sera possible d'établir des liens entre l'homme et la souris en regard de la pathogenèse de l'infection au *C. gattii*.

Des décomptes de CFUs des organes profonds ont aussi été effectués en parallèle de l'histopathologie afin d'étudier la dissémination de *Cryptococcus* (Tableaux VII-VIII). Pour ce qui est de *C. neoformans* H99, la dissémination vers la rate, le foie et le cerveau est faible ou absente à 7 jours (Tableau VII). La dissémination est présente à 14 jours, et beaucoup plus marquée chez les souris Tg comparativement aux non-Tg (Tableau VII). *C. neoformans* H99 infecte tout d'abord les poumons, et la réponse immunitaire déficiente chez les souris Tg augmente la dissémination aux organes profonds. Ces résultats sont aussi observés chez les patients sidéens, chez qui la durée des symptômes cliniques avant le diagnostic de méningo-encéphalite (dissémination vers le cerveau) est beaucoup plus courte comparativement aux patients

immunocompétents (Mitchell and Perfect 1995). L'expression du transgène VIH-1 accélère donc la dissémination de H99 chez les souris Tg. Chez les souris infectées par *C. gattii* R265, la dissémination est minime, autant à 7 jours qu'à 14 jours (Tableau VIII). L'une des causes de la faible dissémination de R265 est que *Cryptococcus* emploie la technique du Cheval de Troie (à l'intérieur des phagocytes, voir introduction) pour disséminer, et que la souche R265 induit une plus faible réponse inflammatoire en empêchant la migration des neutrophiles, ce qui réduit le nombre de cellules disponibles pour transporter *Cryptococcus* vers les organes profonds par voie hématogène (Cheng, Sham et al. 2009). De plus, la cascade du complément est presque totalement inhibée par *C. gattii*, empêchant le recrutement de cellules immunitaires (Mershon, Vasuthasawat et al. 2009). Chez l'homme, la dissémination de *C. gattii* est aussi plus rare que celle de *C. neoformans*, ce qui concorde avec nos résultats dans le modèle murin (Sorrell 2001). Par contre, en pré-mortem, la dissémination de *C. gattii* R265 est plus fréquente (Tableau V), ce qui indique que la dissémination est retardée comparativement à *C. neoformans* H99.

L'histopathologie des poumons a démontré la présence, chez les souris infectées au *C. neoformans* H99, de levures géantes qui n'ont pas été observées chez les animaux infectés au *C. gattii* R265 (Figure 7). Puisque plusieurs chercheurs ont aussi démontré la présence de levures géantes chez *C. neoformans* (Feldmesser, Kress et al. 2001; Okagaki, Strain et al. 2010; Zaragoza, Garcia-Rodas et al. 2010), il était donc pertinent de confirmer ou non ce résultat dans notre modèle. Les diamètres de levures ainsi que l'épaisseur des capsules de *C. neoformans* H99 et *C. gattii* R265 ont donc été mesurés (Tableau IX). Les diamètres des corps cellulaires et épaisseurs des capsules de *C. neoformans* H99 sont plus grands comparativement à *C. gattii* R265, indépendamment de l'expression du transgène VIH-1. *Cryptococcus* provoque la production de plusieurs cytokines par le tissu pulmonaire et les cellules inflammatoires, et les résultats d'histopathologie démontrent que *C. neoformans* entraîne une plus forte réponse inflammatoire que *C. gattii* (voir introduction section immunité). Ceci suggère que *C. neoformans* possède une meilleure protection contre le système immunitaire comparativement à *C. gattii*. *C. neoformans* augmente sa taille ainsi que l'épaisseur de sa capsule en réponse aux phospholipides des

macrophages (Chrisman, Albuquerque et al. 2011). Ceci lui permet de mieux résister à la phagocytose et à l'opsonisation. Puisque les levures géantes sont uniquement présentes dans les poumons des souris infectées par *C. neoformans* (Figure 7, Tableau IX), ce mécanisme lui est donc propre et explique la différence de grosseur entre les deux espèces de *Cryptococcus*. Chez les souris non-Tg pour les deux espèces, les diamètres augmentent après 14 jours d'infection. L'augmentation de l'épaisseur de la capsule est induite par des changements dans l'environnement, par exemple l'établissement de la levure dans les poumons (Bose, Reese et al. 2003; Zaragoza, Fries et al. 2003). Les levures qui survivent à la réponse immunitaire initiale doivent se préparer contre la réponse adaptative en augmentant l'épaisseur de leur capsule. D'ailleurs, la capsule est un facteur de virulence majeur essentiel qui contribue grandement à la survie de *Cryptococcus* chez l'hôte (voir Introduction). À 14 jours, les diamètres cellulaires et l'épaisseur de la capsule étaient plus grands chez les souris non-Tg comparativement aux animaux Tg, pour les deux espèces de *Cryptococcus*. Puisque les souris Tg produisent peu ou pas de réponse inflammatoire contre *Cryptococcus*, il est possible que les phospholipides macrophagiques ne soient pas en concentration suffisante pour induire ces augmentations.

L'histopathologie démontre que l'infection au *Cryptococcus* provoque une inflammation, mais ne permet pas de quantifier les populations de cellules immunitaires présentes durant l'infection. Nous avons donc quantifié par cytométrie en flux les populations de cellules immunitaires dans les poumons de souris infectées ou non au *C. neoformans* H99 et *C. gattii* R265 (Figure 8). Chez les souris Tg, et ce indépendamment de l'infection au *Cryptococcus*, le pourcentage de macrophages interstitiels était significativement augmenté comparativement aux non-Tg. Les macrophages des souris CD4C/HIV<sup>MutA</sup> sont constitutivement activés (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004; Goupil, Trudelle et al. 2009). En effet, la protéine nef du VIH-1 présente dans le transgène est responsable de l'activation des macrophages par sa liaison au CD40, ce qui permet l'infection des lymphocytes (Swingler, Mann et al. 1999; Swingler, Brichacek et al. 2003; Mangino, Percario et al. 2011). Il n'y a pas de différence significative ( $p=0.851$ ) du pourcentage des macrophages interstitiels selon l'infection au *C. neoformans* ou au *C. gattii*, ce qui a aussi été démontré pour les

macrophages pulmonaires totaux dans un autre article (Cheng, Sham et al. 2009). Une tendance ( $p=0.07$ ) vers l'augmentation du pourcentage des macrophages alvéolaires est aussi observée sous l'effet du transgène VIH-1. Enfin, il a été démontré que l'activité fongicide des macrophages pulmonaires humains provenant de patients séropositifs, à l'égard de *C. neoformans*, est perturbée (Cheng, Sham et al. 2009). Des études supplémentaires seront nécessaires afin de confirmer ceci chez nos souris Tg.

L'expression du transgène VIH-1 et l'infection au *Cryptococcus* n'ont produit aucun changement significatif du pourcentage de cellules dendritiques (CDs) pulmonaires (Figure 8). Ce résultat était inattendu, puisque les cellules dendritiques matures sont déplétées chez les souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et que le VIH-1 se réplique dans les cellules dendritiques immatures et entraîne des défauts dans la présentation d'antigènes et la sécrétion de cytokines (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004; Huang, Yang et al. 2011). Une hypothèse est que la déplétion progressive des CDs matures et l'accumulation des CDs immatures à ce stade de l'infection n'est pas assez significative pour montrer une différence. En effet, c'est chez les souris Tg plus vieilles (trois à cinq mois) que la déplétion des CDs matures est démontrée, alors que les souris utilisées pour cette expérience étaient âgées de 1 à 2 mois (Poudrier, Weng et al. 2003). Par contre, Lewandowski et al. ont démontré une déplétion des CDs matures chez les souris jeunes (Lewandowski, Marquis et al. 2006). Cheng et Sham (2009) ont démontré que le pourcentage de cellules dendritiques pulmonaires chez les souris infectées par *C. gattii* R265 était réduit comparativement aux souris infectées par *C. neoformans* H99. Nous avons aussi noté cette différence, mais elle n'est pas significative. Ceci pourrait être dû à une différence génétique entre les lignées de souris utilisées. Il faut par ailleurs noter que la méthode utilisée par Cheng et Sam pour identifier les CDs en cytométrie en flux (discrimination des CDs et des macrophages en se fondant sur leur faible ou forte autofluorescence, respectivement) est très imprécise, ce qui pourrait jouer un rôle dans la fiabilité de leurs résultats.

Pour ce qui est des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, le transgène entraîne une déplétion profonde de ces cellules chez les souris Tg (Figure 8). Elles sont en fait quasi

absentes. Ceci confirme que le modèle transgénique du VIH-1 reproduit fidèlement cet effet du virus sur les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>. Il n'y a pas d'augmentation des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez les souris non-Tg infectées au *Cryptococcus*, ce qui est normal puisqu'à 7 jours, la réponse adaptative n'est pas encore entrée en jeu (Kindt, Goldsby et al. 2007). Par contre, la présence de cellules Th1 est essentielle à la réponse Th1 protectrice contre *Cryptococcus* (Zhang, Wang et al. 2009). Le recrutement pulmonaire de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> en réponse à *Cryptococcus* serait donc à vérifier aux stades plus avancés de l'infection dans des études futures. Les pourcentages de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> chez les souris infectées au *C. neoformans* H99 et *C. gattii* R265 sont très similaires (Figure 8). Ceci indique qu'à 7 jours, l'infection et l'espèce de *Cryptococcus* en cause ne détermine pas le pourcentage de ces cellules. Nous n'avons par contre pas d'information sur la production des cytokines dans le tissu pulmonaire des souris infectées au *Cryptococcus*. Puisqu'il a été démontré que *C. neoformans* et *C. gattii* altèrent la production des cytokines chez plusieurs populations de cellules immunitaires (voir introduction section capsule), il serait pertinent de déterminer l'effet de la souche de *Cryptococcus* et l'expression du transgène VIH-1 sur la production des cytokines pulmonaires, et ce à l'aide de trousse BD CBA (*Cytometric Bead Array*).

Le pourcentage de lymphocytes T CD8<sup>+</sup> est aussi très faible chez les souris Tg comparativement aux souris non-Tg (Figure 8). Ceci se produit aussi lors de l'infection au VIH-1 chez l'homme, et dans les ganglions cervicaux et le sang périphérique des souris Tg CD4C/HIV<sup>MutA</sup> (Lewandowski, Marquis et al. 2006). Il serait intéressant de faire l'expérience à 14 jours afin de déterminer si l'infection au *Cryptococcus* entraîne une augmentation de cette population cellulaire chez les souris Tg et/ou non-Tg.

Il faut remarquer que le ratio CD4 :CD8 chez les non-Tg est inversé chez les souris Tg (2 :1 chez les souris non-Tg et d'environ 1 :2 à une plus faible proportion chez les Tg). Ceci est typique des infections virales, par exemple le VIH-1, chez l'homme et a aussi été démontré chez la souris Tg utilisée (Hanna, Kay et al. 1998). Cet aspect du

modèle est donc fidèle à la pathologie de l'infection au VIH-1 chez l'homme (Hanna, Kay et al. 1998).

Le pourcentage des polymorphonucléaires neutrophiles est légèrement, mais significativement augmenté dans les poumons des souris Tg comparativement aux souris non-Tg, indépendamment de l'infection au *Cryptococcus* (Figure 8). Il a été démontré au laboratoire que le nombre de neutrophiles est aussi augmenté dans le sang périphérique de ces mêmes souris Tg VIH-1 (Marquis, Lewandowski et al. 2006). Le pourcentage augmenté des PMNs dans les poumons des souris Tg pourrait résulter de l'activation constitutive des macrophages par la protéine nef, entraînant une production augmentée de TNF- $\alpha$  par cette population cellulaire et une migration accrue de PMNs (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004; Brown, Kohler et al. 2008). De plus, il pourrait y avoir une forme de compensation fonctionnelle des perturbations immunitaires entraînées par le transgène. Ainsi, le recrutement des neutrophiles pourrait compenser les défauts de fongicidie des macrophages et des cellules dendritiques médiés par *Cryptococcus* (voir introduction section capsule), exerçant ainsi un effet protecteur. Cheng et collègues ont démontré que les souris infectées par *C. gattii* R265 recrutent moins de neutrophiles pulmonaires que celles infectées par *C. neoformans* H99 (Cheng, Sham et al. 2009). Il a été démontré que *C. gattii* inhibe la migration des neutrophiles humains vers le site d'infection (Dong and Murphy 1995; Wright, Bubb et al. 2002). La figure 8 indique qu'il n'y a pas de différence statistiquement significative ( $p=0.407$ ) entre le pourcentage de recrutement des PMNs, au jour 7 après l'infection avec R265 et H99. Il est possible que le patrimoine génétique de nos souris, de lignée C3H, ne permette pas de déceler cette différence, puisque cette lignée de souris est naturellement plus résistante à *Cryptococcus* (Rhodes, Wicker et al. 1980).

En conclusion, seul le transgène altère le pourcentage des cellules immunitaires pulmonaires, au temps précoce de 7 jours après l'infection. Il serait souhaitable de répéter cette expérience au jour 14 après l'infection, afin de mesurer les mêmes populations cellulaires au cours de la phase plus tardive de l'infection, correspondant à l'apparition de la réponse adaptative.

Le dernier résultat présenté démontre le nombre de cellules totales pulmonaires extraites chez les souris Tg et non-Tg selon l'infection par *C. neoformans* H99 et *C. gattii* R265. Il n'y a pas de différence significative entre les groupes (Figure 9). Le nombre de cellules totales du poumon extrait ne change pas. Par contre, la proportion des types de cellules change (Figure 8). Dans l'interprétation de ces résultats, il faut considérer que le broyage des poumons était manuel, suivi d'une étape de filtration. Puisque manuellement, les organes ne peuvent être broyés à 100%, il reste des petits morceaux d'organes qui sont retenus par le filtre. Il y a donc perte de plusieurs cellules. Les multiples étapes de l'expérimentation peuvent aussi entraîner une perte de cellules. Il est donc difficile d'établir des conclusions certaines sur ces résultats. Toutefois, si *C. neoformans* H99 entraîne une plus grande réponse inflammatoire, le nombre de cellules extraites devrait être plus élevé que pour *C. gattii* R265. Théoriquement, nous aurions dû extraire plus de cellules totales chez les souris infectées ainsi que chez les souris non-Tg, comparativement aux souris non-infectées et aux souris Tg, puisque ces dernières présentent une déplétion de lymphocytes. Il faut aussi noter que nous ne pourrions pas observer des différences plus évidentes dans d'autres sites anatomiques que les poumons, puisque les ganglions drainant les poumons ont été prélevés. Ces derniers, appelés iBALT (*inducible bronchus-associated lymphoid tissue*), se développent en présence d'infection ou d'inflammation chronique dans les poumons et, avec l'aide des CD4, sont une niche propice à l'activation des lymphocytes T ainsi qu'à l'éducation des lymphocytes B (Foo and Phipps 2010).

## PERSPECTIVES

L'étude de l'infection par *C. neoformans* et *C. gattii* est loin d'être terminée. À l'aide du modèle murin novateur que nous avons mis au point et caractérisé, des bases solides ont été établies pour poursuivre l'étude de la pathogenèse de la cryptococcose dans le contexte de l'infection au VIH-1.

Tout d'abord, il serait intéressant de reproduire les expériences d'histopathologie et de recrutement de populations cellulaires pulmonaires pour les deux autres souches, soit *C. neoformans* C23 et *C. gattii* R272, puisque ces deux souches démontrent des

résultats de survie et de dissémination différents de *C. neoformans* H99 et *C. gattii* R265. La complétion de cette partie de l'étude offrirait une meilleure compréhension de ces deux souches et permettrait de caractériser d'avantage le modèle. Les comparaisons au niveau de l'histopathologie et du recrutement cellulaire seraient encore plus solides, puisque quatre souches différentes seraient utilisées.

Nous avons démontré peu de différences significatives au niveau du recrutement cellulaire pulmonaire à 7 jours. Par contre, il était possible de noter des tendances, par exemple au niveau des macrophages alvéolaires. De plus, l'histopathologie à 14 jours, pour *C. neoformans* H99, montrait une différence visuelle au niveau de la réponse inflammatoire, comparativement à 7 jours. Il faudra donc effectuer le phénotypage des populations de cellules immunitaires pulmonaires à 14 jours après l'infection afin de déterminer s'il y a une différence ou non du recrutement des populations cellulaires pulmonaires à un stade plus avancé de l'infection et donc démontrer cette différence qualitative de manière quantitative au FACS.

Nous avons démontré une altération du recrutement pour certaines populations cellulaires chez les Tg. Ceci pourrait être causé par le transgène qui perturberait la production de certaines cytokines et chimiokines, ce qui inhiberait le recrutement cellulaire. *Cryptococcus* pourrait aussi être responsable de la modulation de l'expression de certaines cytokines. La capsule de *C. neoformans* permet entre autres une réduction de la production d'IL-2 et d'IFN- $\gamma$ , ainsi qu'une augmentation de la sécrétion d'IL-10 et d'IL-4 (voir introduction, sections capsule et VIH). Il serait donc essentiel d'étudier la production de cytokines par les populations cellulaires pulmonaires, par BD *Cytometric Bead Array*, afin de démontrer ou non une perturbation de la production et la sécrétion de celles-ci.

Nous avons noté une différence de survie chez les souris Tg infectées au *C. neoformans*, comparativement à celles infectées au *C. gattii*. *C. neoformans* engendre une réponse inflammatoire plus forte et dissémine plus efficacement dans les organes profonds. Par ailleurs, nous avons noté la présence de cellules géantes sur les lames d'histopathologie de *C. neoformans*, mais pas sur les lames *C. gattii* R265. Il serait intéressant d'effectuer des recherches comparatives sur lames (histopathologie) avec



notre souche H99 et des souches mutantes pour l'apparition des cellules géantes afin de découvrir le ou les gènes responsables et aussi déterminer si la présence seule de ce facteur serait suffisante pour induire une réponse inflammatoire plus forte, et donc une mort prématurée chez les souris Tg.

Pour ce qui est de *C. gattii* R265, nous avons démontré une quasi-absence de réponse inflammatoire, autant chez les Tg que les non-Tg. On sait déjà que *C. gattii* entraîne une plus faible réponse inflammatoire, comparativement à *C. neoformans*, de par son incapacité à activer la cascade du complément et de l'inhibition du recrutement des neutrophiles (voir Introduction, section «Pathogenèse»). Il est donc aussi très probable que d'autres facteurs de virulence, propres à *C. gattii* R265 n'ont pas encore été découverts. Des études comparatives de virulence de *C. neoformans* H99 et *C. gattii* R265 avec des souris non-Tg permettront d'établir des différences au niveau de chacun des facteurs de virulence communs aux deux espèces. De plus, des études de génotypages seront aussi nécessaires afin de déterminer quels gènes propres à chaque souche sont plus exprimés lors de l'infection.

Nous savons que *Cryptococcus* et le VIH-1 peuvent mutuellement augmenter leur virulence. La gp120 virale induit une réponse non-protectrice envers *Cryptococcus* et ce dernier dérégule la sécrétion de MIP-1 $\beta$ , qui inhibe normalement le rétrovirus (voir introduction, chapitre 2). Les thérapies par injection de cytokines (IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-18) existent déjà, mais elles entraînent de sérieuses toxicités (voir Introduction, section «Traitements de seconde intention»). Il serait intéressant d'effectuer des tests de complémentation par cytokines injectées, différentes de celles déjà utilisées (par exemple MIP-1 $\beta$ ), pour déterminer si cette thérapie serait plus efficace. Il serait aussi possible d'étudier la cinétique des médicaments afin de trouver de nouvelles drogues plus efficaces, sans résistance et qui engendrent moins de toxicité, ou alors trouver des méthodes d'administration plus efficaces.

En bref, comprendre les mécanismes de la susceptibilité différentielle des souris Tg à l'égard de *C. neoformans* et *C. gattii* permettrait de traduire ces nouvelles connaissances vers un contrôle amélioré de la cryptococcose, tant chez les sujets

sains que ceux infectés au VIH-1 et ainsi mettre au point des solutions pour ralentir l'écllosion à Vancouver et limiter l'étendue vers les États-Unis.

## BIBLIOGRAPHIE

- (2010). "Emergence of *Cryptococcus gattii*-- Pacific Northwest, 2004-2010." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **59**(28): 865-868.
- Aguirre, K. and S. Miller (2002). "MHC class II-positive perivascular microglial cells mediate resistance to *Cryptococcus neoformans* brain infection." Glia **39**(2): 184-188.
- Aguirre, K. M., B. A. Garvy, et al. (1997). "Acquired resistance to *Cryptococcus neoformans* in adult mice vaccinated as newborns." Infect Immun **65**(5): 1688-1694.
- Aguirre, K. M. and L. L. Johnson (1997). "A role for B cells in resistance to *Cryptococcus neoformans* in mice." Infect Immun **65**(2): 525-530.
- Alanio, A., M. Desnos-Ollivier, et al. (2011). "Dynamics of *Cryptococcus neoformans*-Macrophage Interactions Reveal that Fungal Background Influences Outcome during Cryptococcal Meningoencephalitis in Humans." MBio **2**(4).
- Almeida, G. M., R. M. Andrade, et al. (2001). "The capsular polysaccharides of *Cryptococcus neoformans* activate normal CD4(+) T cells in a dominant Th2 pattern." J Immunol **167**(10): 5845-5851.
- Alspaugh, J. A., L. M. Cavallo, et al. (2000). "RAS1 regulates filamentation, mating and growth at high temperature of *Cryptococcus neoformans*." Mol Microbiol **36**(2): 352-365.
- Alspaugh, J. A., J. R. Perfect, et al. (1997). "Cryptococcus neoformans mating and virulence are regulated by the G-protein alpha subunit GPA1 and cAMP." Genes Dev **11**(23): 3206-3217.
- Alvarez, M. and A. Casadevall (2006). "Phagosome extrusion and host-cell survival after *Cryptococcus neoformans* phagocytosis by macrophages." Curr Biol **16**(21): 2161-2165.
- Alvarez, M. and A. Casadevall (2007). "Cell-to-cell spread and massive vacuole formation after *Cryptococcus neoformans* infection of murine macrophages." BMC Immunol **8**: 16.
- Alvarez, M., C. Saylor, et al. (2008). "Antibody action after phagocytosis promotes *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* macrophage exocytosis with biofilm-like microcolony formation." Cell Microbiol **10**(8): 1622-1633.
- Aratani, Y., F. Kura, et al. (2006). "Contribution of the myeloperoxidase-dependent oxidative system to host defence against *Cryptococcus neoformans*." J Med Microbiol **55**(Pt 9): 1291-1299.
- Arora, S., Y. Hernandez, et al. (2005). "Role of IFN-gamma in regulating T2 immunity and the development of alternatively activated macrophages during allergic bronchopulmonary mycosis." J Immunol **174**(10): 6346-6356.
- Arora, S., M. A. Olszewski, et al. (2011). "Effect of cytokine interplay on macrophage polarization during chronic pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **79**(5): 1915-1926.
- Baddley, J. W., J. R. Perfect, et al. (2008). "Pulmonary cryptococcosis in patients without HIV infection: factors associated with disseminated disease." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **27**(10): 937-943.

- Bahn, Y. S. and F. A. Muhlschlegel (2006). "CO<sub>2</sub> sensing in fungi and beyond." Curr Opin Microbiol **9**(6): 572-578.
- Ballou, E. R., C. B. Nichols, et al. (2010). "Two CDC42 paralogues modulate *Cryptococcus neoformans* thermotolerance and morphogenesis under host physiological conditions." Mol Microbiol **75**(3): 763-780.
- Barbosa, F. M., F. L. Fonseca, et al. (2007). "Binding of glucuronoxylomannan to the CD14 receptor in human A549 alveolar cells induces interleukin-8 production." Clin Vaccine Immunol **14**(1): 94-98.
- Barbosa, F. M., F. L. Fonseca, et al. (2006). "Glucuronoxylomannan-mediated interaction of *Cryptococcus neoformans* with human alveolar cells results in fungal internalization and host cell damage." Microbes Infect **8**(2): 493-502.
- Barchiesi, F., M. Cogliati, et al. (2005). "Comparative analysis of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans* serotypes A, D and AD in murine cryptococcosis." J Infect **51**(1): 10-16.
- Barluzzi, R., A. Brozzetti, et al. (2000). "Establishment of protective immunity against cerebral cryptococcosis by means of an avirulent, non melanogenic *Cryptococcus neoformans* strain." J Neuroimmunol **109**(2): 75-86.
- Barnett, J. A. (2010). "A history of research on yeasts 14: medical yeasts part 2, *Cryptococcus neoformans*." Yeast **27**(11): 875-904.
- Bauman, S. K., G. B. Huffnagle, et al. (2003). "Effects of tumor necrosis factor alpha on dendritic cell accumulation in lymph nodes draining the immunization site and the impact on the anticryptococcal cell-mediated immune response." Infect Immun **71**(1): 68-74.
- Bauman, S. K., K. L. Nichols, et al. (2000). "Dendritic cells in the induction of protective and nonprotective anticryptococcal cell-mediated immune responses." J Immunol **165**(1): 158-167.
- Beenhouwer, D. O., E. M. Yoo, et al. (2007). "Human immunoglobulin G2 (IgG2) and IgG4, but not IgG1 or IgG3, protect mice against *Cryptococcus neoformans* infection." Infect Immun **75**(3): 1424-1435.
- Biondo, C., A. Midiri, et al. (2005). "MyD88 and TLR2, but not TLR4, are required for host defense against *Cryptococcus neoformans*." Eur J Immunol **35**(3): 870-878.
- Black, K. E. and L. R. Baden (2007). "Fungal infections of the CNS: treatment strategies for the immunocompromised patient." CNS Drugs **21**(4): 293-318.
- Bose, I., A. J. Reese, et al. (2003). "A yeast under cover: the capsule of *Cryptococcus neoformans*." Eukaryot Cell **2**(4): 655-663.
- Botts, M. R., S. S. Giles, et al. (2009). "Isolation and characterization of *Cryptococcus neoformans* spores reveal a critical role for capsule biosynthesis genes in spore biogenesis." Eukaryot Cell **8**(4): 595-605.
- Botts, M. R. and C. M. Hull (2010). "Dueling in the lung: how *Cryptococcus* spores race the host for survival." Curr Opin Microbiol **13**(4): 437-442.
- Bovers, M., F. Hagen, et al. (2008). "Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex." Rev Iberoam Micol **25**(1): S4-12.
- Bovers, M., F. Hagen, et al. (2009). "Promiscuous mitochondria in *Cryptococcus gattii*." FEMS Yeast Res **9**(3): 489-503.

- Brady, H. J., D. J. Pennington, et al. (1994). "Transgenic mice as models of human immunodeficiency virus expression and related cellular effects." J Gen Virol **75 ( Pt 10)**: 2549-2558.
- Brouwer, A. E., A. A. Siddiqui, et al. (2007). "Immune dysfunction in HIV-seronegative, *Cryptococcus gattii* meningitis." J Infect **54(3)**: e165-168.
- Brown, J. N., J. J. Kohler, et al. (2008). "HIV-1 activates macrophages independent of Toll-like receptors." PLoS One **3(12)**: e3664.
- Brummer, E. and D. A. Stevens (2010). "Collectins and fungal pathogens: roles of surfactant proteins and mannose binding lectin in host resistance." Med Mycol **48(1)**: 16-28.
- Bryan, R. A., Z. Jiang, et al. (2010). "Radioimmunotherapy is more effective than antifungal treatment in experimental cryptococcal infection." J Infect Dis **202(4)**: 633-637.
- Buchanan, K. L. and H. A. Doyle (2000). "Requirement for CD4(+) T lymphocytes in host resistance against *Cryptococcus neoformans* in the central nervous system of immunized mice." Infect Immun **68(2)**: 456-462.
- Buchanan, K. L. and J. W. Murphy (1998). "What makes *Cryptococcus neoformans* a pathogen?" Emerg Infect Dis **4(1)**: 71-83.
- Bui, T., X. Lin, et al. (2008). "Isolates of *Cryptococcus neoformans* from infected animals reveal genetic exchange in unisexual, alpha mating type populations." Eukaryot Cell **7(10)**: 1771-1780.
- Byrnes, E. J., 3rd, R. J. Bildfell, et al. (2009). "Molecular evidence that the range of the Vancouver Island outbreak of *Cryptococcus gattii* infection has expanded into the Pacific Northwest in the United States." J Infect Dis **199(7)**: 1081-1086.
- Byrnes, E. J., 3rd, W. Li, et al. (2010). "Emergence and pathogenicity of highly virulent *Cryptococcus gattii* genotypes in the northwest United States." PLoS Pathog **6(4)**: e1000850.
- Byrnes, E. J., 3rd and K. A. Marr (2011). "The Outbreak of *Cryptococcus gattii* in Western North America: Epidemiology and Clinical Issues." Curr Infect Dis Rep **13(3)**: 256-261.
- Byrnes, E. J. and J. Heitman (2009). "*Cryptococcus gattii* outbreak expands into the Northwestern United States with fatal consequences." F1000 Biol Rep **1**.
- Campbell, L. T. and D. A. Carter (2006). "Looking for sex in the fungal pathogens *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*." FEMS Yeast Res **6(4)**: 588-598.
- Carroll, S. F., L. Guillot, et al. (2007). "Mammalian model hosts of cryptococcal infection." Comp Med **57(1)**: 9-17.
- Casadevall, A. (1995). "Antibody immunity and invasive fungal infections." Infect Immun **63(11)**: 4211-4218.
- Casadevall, A. (2010). "Cryptococci at the brain gate: break and enter or use a Trojan horse?" J Clin Invest **120(5)**: 1389-1392.
- Casadevall, A., M. Feldmesser, et al. (2002). "Induced humoral immunity and vaccination against major human fungal pathogens." Curr Opin Microbiol **5(4)**: 386-391.

- Casadevall, A. and L. Pirofski (2005). "Insights into mechanisms of antibody-mediated immunity from studies with *Cryptococcus neoformans*." Curr Mol Med **5**(4): 421-433.
- Chakrabarti, A. (2007). "Epidemiology of central nervous system mycoses." Neurol India **55**(3): 191-197.
- Chakrabarti, A., M. Jatana, et al. (1997). "Isolation of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* from *Eucalyptus camaldulensis* in India." J Clin Microbiol **35**(12): 3340-3342.
- Chambers, C., L. MacDougall, et al. (2008). "Tourism and specific risk areas for *Cryptococcus gattii*, Vancouver Island, Canada." Emerg Infect Dis **14**(11): 1781-1783.
- Chamilos, G., M. S. Lionakis, et al. (2007). "Role of mini-host models in the study of medically important fungi." Lancet Infect Dis **7**(1): 42-55.
- Chan, M. Y. and S. T. Tay (2010). "Enzymatic characterisation of clinical isolates of *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* and other environmental *Cryptococcus* spp." Mycoses **53**(1): 26-31.
- Chang, Y. C., M. F. Stins, et al. (2004). "Cryptococcal yeast cells invade the central nervous system via transcellular penetration of the blood-brain barrier." Infect Immun **72**(9): 4985-4995.
- Chang, Y. C., B. L. Wickes, et al. (2000). "*Cryptococcus neoformans* STE12alpha regulates virulence but is not essential for mating." J Exp Med **191**(5): 871-882.
- Chang, Z. L., D. Netski, et al. (2006). "Binding and internalization of glucuronoxylomannan, the major capsular polysaccharide of *Cryptococcus neoformans*, by murine peritoneal macrophages." Infect Immun **74**(1): 144-151.
- Charlier, C., F. Chretien, et al. (2005). "Capsule structure changes associated with *Cryptococcus neoformans* crossing of the blood-brain barrier." Am J Pathol **166**(2): 421-432.
- Charlier, C., K. Nielsen, et al. (2009). "Evidence of a role for monocytes in dissemination and brain invasion by *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **77**(1): 120-127.
- Chaturvedi, V., B. Wong, et al. (1996). "Oxidative killing of *Cryptococcus neoformans* by human neutrophils. Evidence that fungal mannitol protects by scavenging reactive oxygen intermediates." J Immunol **156**(10): 3836-3840.
- Chayakulkeeree, M., S. A. Johnston, et al. (2011). "SEC14 is a specific requirement for secretion of phospholipase B1 and pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*." Mol Microbiol **80**(4): 1088-1101.
- Chen, G. H., M. A. Olszewski, et al. (2007). "Role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor in host defense against pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection during murine allergic bronchopulmonary mycosis." Am J Pathol **170**(3): 1028-1040.
- Chen, G. H., J. J. Osterholzer, et al. (2010). "Dual roles of CD40 on microbial containment and the development of immunopathology in response to persistent fungal infection in the lung." Am J Pathol **177**(5): 2459-2471.

- Chen, S., T. Sorrell, et al. (2000). "Epidemiology and host- and variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. Australasian Cryptococcal Study Group." Clin Infect Dis **31**(2): 499-508.
- Chen, S. H., M. F. Stins, et al. (2003). "Cryptococcus neoformans induces alterations in the cytoskeleton of human brain microvascular endothelial cells." J Med Microbiol **52**(Pt 11): 961-970.
- Cheng, P. Y., A. Sham, et al. (2009). "Cryptococcus gattii isolates from the British Columbia cryptococcosis outbreak induce less protective inflammation in a murine model of infection than *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **77**(10): 4284-4294.
- Chiapello, L. S., J. L. Baronetti, et al. (2008). "Cryptococcus neoformans glucuronoxylomannan induces macrophage apoptosis mediated by nitric oxide in a caspase-independent pathway." Int Immunol **20**(12): 1527-1541.
- Chow, S. K. and A. Casadevall (2011). "Evaluation of *Cryptococcus neoformans* galactoxylomannan-protein conjugate as vaccine candidate against murine cryptococcosis." Vaccine **29**(10): 1891-1898.
- Chrisman, C. J., P. Albuquerque, et al. (2011). "Phospholipids trigger *Cryptococcus neoformans* capsular enlargement during interactions with amoebae and macrophages." PLoS Pathog **7**(5): e1002047.
- Chrisman, C. J., M. Alvarez, et al. (2010). "Phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* by, and nonlytic exocytosis from, *Acanthamoeba castellanii*." Appl Environ Microbiol **76**(18): 6056-6062.
- Chun, C. D., O. W. Liu, et al. (2007). "A link between virulence and homeostatic responses to hypoxia during infection by the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*." PLoS Pathog **3**(2): e22.
- Chun, C. D. and H. D. Madhani (2010). "Ctr2 links copper homeostasis to polysaccharide capsule formation and phagocytosis inhibition in the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*." PLoS One **5**(9).
- Coenjaerts, F. E., A. M. Walenkamp, et al. (2001). "Potent inhibition of neutrophil migration by cryptococcal mannoprotein-4-induced desensitization." J Immunol **167**(7): 3988-3995.
- Cohen, M. S., G. M. Shaw, et al. (2011). "Acute HIV-1 Infection." N Engl J Med **364**(20): 1943-1954.
- Cordero, R. J., S. Frases, et al. (2011). "Evidence for branching in cryptococcal capsular polysaccharides and consequences on its biological activity." Mol Microbiol **79**(4): 1101-1117.
- Costa, M. L., J. P. Souza, et al. (2009). "Cryptococcal meningitis in HIV negative pregnant women: case report and review of literature." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **51**(5): 289-294.
- Cowen, L. E. and W. J. Steinbach (2008). "Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance." Eukaryot Cell **7**(5): 747-764.
- Cox, G. M., T. S. Harrison, et al. (2003). "Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus neoformans* by affecting growth within macrophages." Infect Immun **71**(1): 173-180.

- Cox, G. M., J. Mukherjee, et al. (2000). "Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis." Infect Immun **68**(2): 443-448.
- D'Souza, C. A., J. A. Alspaugh, et al. (2001). "Cyclic AMP-dependent protein kinase controls virulence of the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*." Mol Cell Biol **21**(9): 3179-3191.
- D'Souza, C. A. and J. Heitman (2001). "It infects me, it infects me not: phenotypic switching in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*." J Clin Invest **108**(11): 1577-1578.
- D'Souza, C. A., J. W. Kronstad, et al. (2011). "Genome variation in *Cryptococcus gattii*, an emerging pathogen of immunocompetent hosts." MBio **2**(1): e00342-00310.
- Dan, J. M., R. M. Kelly, et al. (2008). "Role of the mannose receptor in a murine model of *Cryptococcus neoformans* infection." Infect Immun **76**(6): 2362-2367.
- Dan, J. M., J. P. Wang, et al. (2008). "Cooperative stimulation of dendritic cells by *Cryptococcus neoformans* mannoproteins and CpG oligodeoxynucleotides." PLoS One **3**(4): e2046.
- Datta, K., K. H. Bartlett, et al. (2009). "Spread of *Cryptococcus gattii* into Pacific Northwest region of the United States." Emerg Infect Dis **15**(8): 1185-1191.
- Datta, K., A. Lees, et al. (2008). "Therapeutic efficacy of a conjugate vaccine containing a peptide mimotope of cryptococcal capsular polysaccharide glucuronoxylomannan." Clin Vaccine Immunol **15**(8): 1176-1187.
- Datta, K. and L. A. Pirofski (2006). "Towards a vaccine for *Cryptococcus neoformans*: principles and caveats." FEMS Yeast Res **6**(4): 525-536.
- Davis, J. A., D. L. Horn, et al. (2009). "Central nervous system involvement in cryptococcal infection in individuals after solid organ transplantation or with AIDS." Transpl Infect Dis **11**(5): 432-437.
- De Jesus, M., A. M. Nicola, et al. (2009). "Galactoxylomannan-mediated immunological paralysis results from specific B cell depletion in the context of widespread immune system damage." J Immunol **183**(6): 3885-3894.
- De Jesus, M., A. M. Nicola, et al. (2009). "Capsular localization of the *Cryptococcus neoformans* polysaccharide component galactoxylomannan." Eukaryot Cell **8**(1): 96-103.
- de Repentigny, L., D. Lewandowski, et al. (2004). "Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection." Clin Microbiol Rev **17**(4): 729-759, table of contents.
- Devi, S. J. (1996). "Preclinical efficacy of a glucuronoxylomannan-tetanus toxoid conjugate vaccine of *Cryptococcus neoformans* in a murine model." Vaccine **14**(9): 841-844.
- Djordjevic, J. T. (2010). "Role of phospholipases in fungal fitness, pathogenicity, and drug development - lessons from *Cryptococcus neoformans*." Front Microbiol **1**: 125.
- Djordjevic, J. T., M. Del Poeta, et al. (2005). "Secretion of cryptococcal phospholipase B1 (PLB1) is regulated by a glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor." Biochem J **389**(Pt 3): 803-812.



- Dong, Z. M., L. Jackson, et al. (1999). "Mechanisms for induction of L-selectin loss from T lymphocytes by a cryptococcal polysaccharide, glucuronoxylomannan." Infect Immun **67**(1): 220-229.
- Dong, Z. M. and J. W. Murphy (1995). "Effects of the two varieties of *Cryptococcus neoformans* cells and culture filtrate antigens on neutrophil locomotion." Infect Immun **63**(7): 2632-2644.
- Dong, Z. M. and J. W. Murphy (1997). "Cryptococcal polysaccharides bind to CD18 on human neutrophils." Infect Immun **65**(2): 557-563.
- Dromer, F., S. Mathoulin, et al. (1996). "Epidemiology of cryptococcosis in France: a 9-year survey (1985-1993). French Cryptococcosis Study Group." Clin Infect Dis **23**(1): 82-90.
- Duncan, C., H. Schwantje, et al. (2006). "*Cryptococcus gattii* in wildlife of Vancouver Island, British Columbia, Canada." J Wildl Dis **42**(1): 175-178.
- Durden, F. M. and B. Elewski (1997). "Fungal infections in HIV-infected patients." Semin Cutan Med Surg **16**(3): 200-212.
- Duro, R. M., D. Netski, et al. (2003). "Contribution of epitope specificity to the binding of monoclonal antibodies to the capsule of *Cryptococcus neoformans* and the soluble form of its major polysaccharide, glucuronoxylomannan." Clin Diagn Lab Immunol **10**(2): 252-258.
- Edwards, L., A. E. Williams, et al. (2005). "Stimulation via Toll-like receptor 9 reduces *Cryptococcus neoformans*-induced pulmonary inflammation in an IL-12-dependent manner." Eur J Immunol **35**(1): 273-281.
- Eisenman, H. C., S. Frases, et al. (2009). "Vesicle-associated melanization in *Cryptococcus neoformans*." Microbiology **155**(Pt 12): 3860-3867.
- Eisenman, H. C., M. Mues, et al. (2007). "*Cryptococcus neoformans* laccase catalyses melanin synthesis from both D- and L-DOPA." Microbiology **153**(Pt 12): 3954-3962.
- Ellerbroek, P. M., A. I. Hoepelman, et al. (2002). "Cryptococcal glucuronoxylomannan inhibits adhesion of neutrophils to stimulated endothelium in vitro by affecting both neutrophils and endothelial cells." Infect Immun **70**(9): 4762-4771.
- Ellerbroek, P. M., D. J. Lefeber, et al. (2004). "O-acetylation of cryptococcal capsular glucuronoxylomannan is essential for interference with neutrophil migration." J Immunol **173**(12): 7513-7520.
- Elleuche, S. and S. Poggeler (2010). "Carbonic anhydrases in fungi." Microbiology **156**(Pt 1): 23-29.
- Ellis, D. H. (1987). "*Cryptococcus neoformans* var. *gattii* in Australia." J Clin Microbiol **25**(2): 430-431.
- Ellis, D. H. and T. J. Pfeiffer (1990). "Natural habitat of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*." J Clin Microbiol **28**(7): 1642-1644.
- Erb-Downward, J. R., R. M. Noggle, et al. (2008). "The role of laccase in prostaglandin production by *Cryptococcus neoformans*." Mol Microbiol **68**(6): 1428-1437.
- Ernst, J. F. and D. Tielker (2009). "Responses to hypoxia in fungal pathogens." Cell Microbiol **11**(2): 183-190.

- Espinel-Ingroff, A. (2009). "Novel antifungal agents, targets or therapeutic strategies for the treatment of invasive fungal diseases: a review of the literature (2005-2009)." Rev Iberoam Micol **26**(1): 15-22.
- Feldmesser, M., A. Casadevall, et al. (1997). "Eosinophil-Cryptococcus neoformans interactions in vivo and in vitro." Infect Immun **65**(5): 1899-1907.
- Feldmesser, M., Y. Kress, et al. (2001). "Dynamic changes in the morphology of Cryptococcus neoformans during murine pulmonary infection." Microbiology **147**(Pt 8): 2355-2365.
- Feldmesser, M., A. Mednick, et al. (2002). "Antibody-mediated protection in murine Cryptococcus neoformans infection is associated with pleiotropic effects on cytokine and leukocyte responses." Infect Immun **70**(3): 1571-1580.
- Feldmesser, M., S. Tucker, et al. (2001). "Intracellular parasitism of macrophages by Cryptococcus neoformans." Trends Microbiol **9**(6): 273-278.
- Filler, S. G. and D. C. Sheppard (2006). "Fungal invasion of normally non-phagocytic host cells." PLoS Pathog **2**(12): e129.
- Fonseca, F. L., L. L. Nohara, et al. (2010). "Immunomodulatory effects of serotype B glucuronoxylomannan from Cryptococcus gattii correlate with polysaccharide diameter." Infect Immun **78**(9): 3861-3870.
- Foo, S. Y. and S. Phipps (2010). "Regulation of inducible BALT formation and contribution to immunity and pathology." Mucosal Immunol **3**(6): 537-544.
- Forsman, A. and R. A. Weiss (2008). "Why is HIV a pathogen?" Trends Microbiol **16**(12): 555-560.
- Fowler, Z. L., C. M. Baron, et al. (2011). "Melanization of flavonoids by fungal and bacterial laccases." Yeast **28**(3): 181-188.
- Fraser, J. A., S. S. Giles, et al. (2005). "Same-sex mating and the origin of the Vancouver Island Cryptococcus gattii outbreak." Nature **437**(7063): 1360-1364.
- Fraser, J. A., R. L. Subaran, et al. (2003). "Recapitulation of the sexual cycle of the primary fungal pathogen Cryptococcus neoformans var. gattii: implications for an outbreak on Vancouver Island, Canada." Eukaryot Cell **2**(5): 1036-1045.
- Frases, S., B. Pontes, et al. (2009). "Capsule of Cryptococcus neoformans grows by enlargement of polysaccharide molecules." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(4): 1228-1233.
- Frases, S., A. Salazar, et al. (2007). "Cryptococcus neoformans can utilize the bacterial melanin precursor homogentisic acid for fungal melanogenesis." Appl Environ Microbiol **73**(2): 615-621.
- Frealle, E., C. Noel, et al. (2005). "Manganese superoxide dismutase in pathogenic fungi: an issue with pathophysiological and phylogenetic involvements." FEMS Immunol Med Microbiol **45**(3): 411-422.
- Fries, B. C., D. L. Goldman, et al. (1999). "Phenotypic switching in Cryptococcus neoformans results in changes in cellular morphology and glucuronoxylomannan structure." Infect Immun **67**(11): 6076-6083.
- Fries, B. C., S. C. Lee, et al. (2005). "Phenotypic switching of Cryptococcus neoformans can produce variants that elicit increased intracranial pressure in

- a rat model of cryptococcal meningoencephalitis." *Infect Immun* **73**(3): 1779-1787.
- Fuchs, B. B., R. J. Tang, et al. (2007). "The temperature-sensitive role of *Cryptococcus neoformans* ROM2 in cell morphogenesis." *PLoS One* **2**(4): e368.
- Galanis, E., L. Hoang, et al. (2009). "Clinical presentation, diagnosis and management of *Cryptococcus gattii* cases: Lessons learned from British Columbia." *Can J Infect Dis Med Microbiol* **20**(1): 23-28.
- Galanis, E. and L. Macdougall (2010). "Epidemiology of *Cryptococcus gattii*, British Columbia, Canada, 1999-2007." *Emerg Infect Dis* **16**(2): 251-257.
- Ganendren, R., E. Carter, et al. (2006). "Phospholipase B activity enhances adhesion of *Cryptococcus neoformans* to a human lung epithelial cell line." *Microbes Infect* **8**(4): 1006-1015.
- Garcia-Hermoso, D., F. Dromer, et al. (2004). "*Cryptococcus neoformans* capsule structure evolution in vitro and during murine infection." *Infect Immun* **72**(6): 3359-3365.
- Garcia-Hermoso, D., G. Janbon, et al. (1999). "Epidemiological evidence for dormant *Cryptococcus neoformans* infection." *J Clin Microbiol* **37**(10): 3204-3209.
- Garcia-Rivera, J., S. C. Tucker, et al. (2005). "Laccase expression in murine pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection." *Infect Immun* **73**(5): 3124-3127.
- Garro, A. P., L. S. Chiapello, et al. (2011). "Rat eosinophils stimulate the expansion of *Cryptococcus neoformans*-specific CD4(+) and CD8(+) T cells with a T-helper 1 profile." *Immunology* **132**(2): 174-187.
- Gatti, F. and R. Eeckels (1970). "An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. I. Description of the disease and of the strain." *Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol* **50**(6): 689-693.
- Gerik, K. J., S. R. Bhimireddy, et al. (2008). "PKC1 is essential for protection against both oxidative and nitrosative stresses, cell integrity, and normal manifestation of virulence factors in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*." *Eukaryot Cell* **7**(10): 1685-1698.
- Geunes-Boyer, S., T. N. Oliver, et al. (2009). "Surfactant protein D increases phagocytosis of hypocapsular *Cryptococcus neoformans* by murine macrophages and enhances fungal survival." *Infect Immun* **77**(7): 2783-2794.
- Giles, S. S., I. Batinic-Haberle, et al. (2005). "*Cryptococcus neoformans* mitochondrial superoxide dismutase: an essential link between antioxidant function and high-temperature growth." *Eukaryot Cell* **4**(1): 46-54.
- Giles, S. S., T. R. Dagenais, et al. (2009). "Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*." *Infect Immun* **77**(8): 3491-3500.
- Goldman, D., X. Song, et al. (2001). "*Cryptococcus neoformans* induces macrophage inflammatory protein 1alpha (MIP-1alpha) and MIP-1beta in human microglia: role of specific antibody and soluble capsular polysaccharide." *Infect Immun* **69**(3): 1808-1815.

- Goldman, D. L., B. C. Fries, et al. (1998). "Phenotypic switching in the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* is associated with changes in virulence and pulmonary inflammatory response in rodents." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(25): 14967-14972.
- Goldman, D. L., S. C. Lee, et al. (1995). "Tissue localization of *Cryptococcus neoformans* glucuronoxylomannan in the presence and absence of specific antibody." Infect Immun **63**(9): 3448-3453.
- Gomez-Lopez, A., O. Zaragoza, et al. (2008). "Pharmacotherapy of yeast infections." Expert Opin Pharmacother **9**(16): 2801-2816.
- Gomez, B. L. and J. D. Nosanchuk (2003). "Melanin and fungi." Curr Opin Infect Dis **16**(2): 91-96.
- Gorzelanny, C., B. Poppelmann, et al. (2010). "Human macrophage activation triggered by chitotriosidase-mediated chitin and chitosan degradation." Biomaterials **31**(33): 8556-8563.
- 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): 4136-4149.
- Grechi, J., M. Marinho-Carvalho, et al. (2011). "Glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* down-regulates the enzyme 6-phosphofructo-1-kinase of macrophages." J Biol Chem **286**(17): 14820-14829.
- Greub, G. and D. Raoult (2004). "Microorganisms resistant to free-living amoebae." Clin Microbiol Rev **17**(2): 413-433.
- Guerrero, A. and B. C. Fries (2008). "Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans* contributes to virulence by changing the immunological host response." Infect Immun **76**(9): 4322-4331.
- Guerrero, A., N. Jain, et al. (2006). "Phenotypic switching in *Cryptococcus neoformans*." Microbiology **152**(Pt 1): 3-9.
- Guerrero, A., N. Jain, et al. (2010). "*Cryptococcus neoformans* variants generated by phenotypic switching differ in virulence through effects on macrophage activation." Infect Immun **78**(3): 1049-1057.
- Guillot, L., S. F. Carroll, et al. (2008). "*Cryptococcus neoformans* induces IL-8 secretion and CXCL1 expression by human bronchial epithelial cells." Respir Res **9**: 9.
- Guimaraes, A. J., S. Frases, et al. (2010). "*Cryptococcus neoformans* responds to mannitol by increasing capsule size in vitro and in vivo." Cell Microbiol **12**(6): 740-753.
- Gultasli, N. Z., K. Ercan, et al. (2007). "MRI findings of intramedullary spinal cryptococcoma." Diagn Interv Radiol **13**(2): 64-67.
- Gupta, G. and B. C. Fries (2010). "Variability of phenotypic traits in *Cryptococcus* varieties and species and the resulting implications for pathogenesis." Future Microbiol **5**(5): 775-787.
- Haag-Wackernagel, D. and H. Moch (2004). "Health hazards posed by feral pigeons." J Infect **48**(4): 307-313.
- Hagen, F. and T. Boekhout (2010). "The search for the natural habitat of *Cryptococcus gattii*." Mycopathologia **170**(4): 209-211.

- Hanna, Z., D. G. Kay, et al. (1998). "Transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1 in immune cells develop a severe AIDS-like disease." *J Virol* **72**(1): 121-132.
- Hanna, Z., D. G. Kay, 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): 163-175.
- Hardison, S. E., S. Ravi, et al. (2010). "Pulmonary infection with an interferon-gamma-producing *Cryptococcus neoformans* strain results in classical macrophage activation and protection." *Am J Pathol* **176**(2): 774-785.
- Hardison, S. E., K. L. Wozniak, et al. (2010). "Interleukin-17 is not required for classical macrophage activation in a pulmonary mouse model of *Cryptococcus neoformans* infection." *Infect Immun* **78**(12): 5341-5351.
- Harrington, L. E., R. D. Hatton, et al. (2005). "Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages." *Nat Immunol* **6**(11): 1123-1132.
- Harrison, T. S. (2000). "Cryptococcus neoformans and cryptococcosis." *J Infect* **41**(1): 12-17.
- Harrison, T. S. and S. M. Levitz (1997). "Mechanisms of impaired anticryptococcal activity of monocytes from donors infected with human immunodeficiency virus." *J Infect Dis* **176**(2): 537-540.
- Harrison, T. S., S. Nong, et al. (1997). "Induction of human immunodeficiency virus type 1 expression in monocytic cells by *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*." *J Infect Dis* **176**(2): 485-491.
- He, W., A. Casadevall, et al. (2003). "Phagocytic activity and monocyte chemotactic protein expression by pulmonary macrophages in persistent pulmonary cryptococcosis." *Infect Immun* **71**(2): 930-936.
- Hernandez, Y., S. Arora, et al. (2005). "Distinct roles for IL-4 and IL-10 in regulating T2 immunity during allergic bronchopulmonary mycosis." *J Immunol* **174**(2): 1027-1036.
- Herring, A. C., N. R. Falkowski, et al. (2005). "Transient neutralization of tumor necrosis factor alpha can produce a chronic fungal infection in an immunocompetent host: potential role of immature dendritic cells." *Infect Immun* **73**(1): 39-49.
- Herring, A. C., J. Lee, et al. (2002). "Induction of interleukin-12 and gamma interferon requires tumor necrosis factor alpha for protective T1-cell-mediated immunity to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection." *Infect Immun* **70**(6): 2959-2964.
- Hidore, M. R., N. Nabavi, et al. (1991). "Murine natural killer cells are fungicidal to *Cryptococcus neoformans*." *Infect Immun* **59**(5): 1747-1754.
- Hill, J. O. (1992). "CD4+ T cells cause multinucleated giant cells to form around *Cryptococcus neoformans* and confine the yeast within the primary site of infection in the respiratory tract." *J Exp Med* **175**(6): 1685-1695.
- Hoang, L. M., J. A. Maguire, et al. (2004). "Cryptococcus neoformans infections at Vancouver Hospital and Health Sciences Centre (1997-2002): epidemiology, microbiology and histopathology." *J Med Microbiol* **53**(Pt 9): 935-940.

- Hogg, A. E., G. C. Bowick, et al. (2009). "Induction of granulysin in CD8+ T cells by IL-21 and IL-15 is suppressed by human immunodeficiency virus-1." J Leukoc Biol **86**(5): 1191-1203.
- Honda, T., Y. Miyachi, et al. (2011). "Regulatory T cells in cutaneous immune responses." J Dermatol Sci **63**(2): 75-82.
- Howard, D. H. (1999). "Acquisition, transport, and storage of iron by pathogenic fungi." Clin Microbiol Rev **12**(3): 394-404.
- Hu, G., P. Y. Cheng, et al. (2008). "Metabolic adaptation in *Cryptococcus neoformans* during early murine pulmonary infection." Mol Microbiol **69**(6): 1456-1475.
- Huang, J., Y. Yang, et al. (2011). "Dendritic cell dysfunction during primary HIV-1 infection." J Infect Dis **204**(10): 1557-1562.
- Huang, S. H., M. Long, et al. (2011). "Invasion of *Cryptococcus neoformans* into human brain microvascular endothelial cells is mediated through the lipid rafts-endocytic pathway via the dual specificity tyrosine-phosphorylation-regulated kinase 3 (DYRK3)." J Biol Chem.
- Huffnagle, G. B., M. B. Boyd, et al. (1998). "IL-5 is required for eosinophil recruitment, crystal deposition, and mononuclear cell recruitment during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection in genetically susceptible mice (C57BL/6)." J Immunol **160**(5): 2393-2400.
- Huffnagle, G. B., L. K. McNeil, et al. (1999). "Cutting edge: Role of C-C chemokine receptor 5 in organ-specific and innate immunity to *Cryptococcus neoformans*." J Immunol **163**(9): 4642-4646.
- Huffnagle, G. B., R. M. Strieter, et al. (1997). "Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) is required for the efferent phase of pulmonary cell-mediated immunity to a *Cryptococcus neoformans* infection." J Immunol **159**(1): 318-327.
- Huffnagle, G. B., R. M. Strieter, et al. (1995). "The role of monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in the recruitment of monocytes and CD4+ T cells during a pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection." J Immunol **155**(10): 4790-4797.
- Hull, C. M. and J. Heitman (2002). "Genetics of *Cryptococcus neoformans*." Annu Rev Genet **36**: 557-615.
- Husain, S., M. M. Wagener, et al. (2001). "*Cryptococcus neoformans* infection in organ transplant recipients: variables influencing clinical characteristics and outcome." Emerg Infect Dis **7**(3): 375-381.
- Idnurm, A., Y. S. Bahn, et al. (2005). "Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*." Nat Rev Microbiol **3**(10): 753-764.
- Ieong, M. H., C. C. Reardon, et al. (2000). "Human immunodeficiency virus type 1 infection of alveolar macrophages impairs their innate fungicidal activity." Am J Respir Crit Care Med **162**(3 Pt 1): 966-970.
- Ingavale, S. S., Y. C. Chang, et al. (2008). "Importance of mitochondria in survival of *Cryptococcus neoformans* under low oxygen conditions and tolerance to cobalt chloride." PLoS Pathog **4**(9): e1000155.
- Innocenti, A., R. A. Hall, et al. (2010). "Carbonic anhydrase activators: activation of the beta-carbonic anhydrases from the pathogenic fungi *Candida albicans* and

- Cryptococcus neoformans with amines and amino acids." Bioorg Med Chem **18**(3): 1034-1037.
- Jackson, A. and M. C. Hosseinipour (2010). "Management of cryptococcal meningitis in sub-saharan Africa." Curr HIV/AIDS Rep **7**(3): 134-142.
- Jacobson, E. S. (2000). "Pathogenic roles for fungal melanins." Clin Microbiol Rev **13**(4): 708-717.
- Jain, A. V., Y. Zhang, et al. (2009). "Th2 but not Th1 immune bias results in altered lung functions in a murine model of pulmonary Cryptococcus neoformans infection." Infect Immun **77**(12): 5389-5399.
- Jain, N., E. Cook, et al. (2009). "Isolation and characterization of senescent Cryptococcus neoformans and implications for phenotypic switching and pathogenesis in chronic cryptococcosis." Eukaryot Cell **8**(6): 858-866.
- Jain, N. and B. C. Fries (2008). "Phenotypic switching of Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii." Mycopathologia **166**(4): 181-188.
- Jain, N., A. Guerrero, et al. (2006). "Phenotypic switching and its implications for the pathogenesis of Cryptococcus neoformans." FEMS Yeast Res **6**(4): 480-488.
- Jain, N., L. Li, et al. (2006). "Phenotypic switching in a Cryptococcus neoformans variety gattii strain is associated with changes in virulence and promotes dissemination to the central nervous system." Infect Immun **74**(2): 896-903.
- Janbon, G. (2004). "Cryptococcus neoformans capsule biosynthesis and regulation." FEMS Yeast Res **4**(8): 765-771.
- Jarvis, J. N., F. Dromer, et al. (2008). "Managing cryptococcosis in the immunocompromised host." Curr Opin Infect Dis **21**(6): 596-603.
- Jean, S. S., C. T. Fang, et al. (2002). "Cryptococcaemia: clinical features and prognostic factors." QJM **95**(8): 511-518.
- Jenney, A., K. Pandithage, et al. (2004). "Cryptococcus infection in tropical Australia." J Clin Microbiol **42**(8): 3865-3868.
- Jiang, N., N. Sun, et al. (2009). "A copper-responsive factor gene CUF1 is required for copper induction of laccase in Cryptococcus neoformans." FEMS Microbiol Lett **296**(1): 84-90.
- Johnston, S. A. and R. C. May (2010). "The human fungal pathogen Cryptococcus neoformans escapes macrophages by a phagosome emptying mechanism that is inhibited by Arp2/3 complex-mediated actin polymerisation." PLoS Pathog **6**(8): e1001041.
- Jong, A., C. H. Wu, et al. (2008). "Invasion of Cryptococcus neoformans into human brain microvascular endothelial cells requires protein kinase C-alpha activation." Cell Microbiol **10**(9): 1854-1865.
- Jong, A. Y., C. H. Wu, et al. (2007). "HIV-1 gp41 ectodomain enhances Cryptococcus neoformans binding to HBMEC." Biochem Biophys Res Commun **356**(4): 899-905.
- Jongwutiwes, U., S. Sungkanuparph, et al. (2008). "Comparison of clinical features and survival between cryptococcosis in human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients." Jpn J Infect Dis **61**(2): 111-115.
- Jung, W. H., G. Hu, et al. (2009). "Role of ferroxidases in iron uptake and virulence of Cryptococcus neoformans." Eukaryot Cell **8**(10): 1511-1520.

- Jung, W. H. and J. W. Kronstad (2008). "Iron and fungal pathogenesis: a case study with *Cryptococcus neoformans*." Cell Microbiol **10**(2): 277-284.
- Jung, W. H. and J. W. Kronstad (2011). "The iron-responsive, GATA-type transcription factor Cir1 influences mating in *Cryptococcus neoformans*." Mol Cells **31**(1): 73-77.
- Jung, W. H., S. Saikia, et al. (2010). "HapX positively and negatively regulates the transcriptional response to iron deprivation in *Cryptococcus neoformans*." PLoS Pathog **6**(11): e1001209.
- Jung, W. H., A. Sham, et al. (2006). "Iron regulation of the major virulence factors in the AIDS-associated pathogen *Cryptococcus neoformans*." PLoS Biol **4**(12): e410.
- Kawakami, K. (2002). "Interleukin-18 and host defense against infectious pathogens." J Immunother **25 Suppl 1**: S12-19.
- Kawakami, K. (2003). "Promising immunotherapies with Th1-related cytokines against infectious diseases." J Infect Chemother **9**(3): 201-209.
- Kawakami, K. (2004). "Regulation by innate immune T lymphocytes in the host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*." Jpn J Infect Dis **57**(4): 137-145.
- Kawakami, K., Y. Kinjo, et al. (2001). "Monocyte chemoattractant protein-1-dependent increase of V alpha 14 NKT cells in lungs and their roles in Th1 response and host defense in cryptococcal infection." J Immunol **167**(11): 6525-6532.
- Kawakami, K., Y. Kinjo, et al. (2001). "Activation of Valpha14(+) natural killer T cells by alpha-galactosylceramide results in development of Th1 response and local host resistance in mice infected with *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **69**(1): 213-220.
- Kawakami, K., Y. Kinjo, et al. (2001). "Enhanced gamma interferon production through activation of Valpha14(+) natural killer T cells by alpha-galactosylceramide in interleukin-18-deficient mice with systemic cryptococcosis." Infect Immun **69**(11): 6643-6650.
- Kawakami, K., Y. Koguchi, et al. (2000). "IL-18 contributes to host resistance against infection with *Cryptococcus neoformans* in mice with defective IL-12 synthesis through induction of IFN-gamma production by NK cells." J Immunol **165**(2): 941-947.
- Kawakami, K., S. Kohno, et al. (1994). "Activation of macrophages and expansion of specific T lymphocytes in the lungs of mice intratracheally inoculated with *Cryptococcus neoformans*." Clin Exp Immunol **96**(2): 230-237.
- Kawakami, K., M. H. Qureshi, et al. (1999). "Interferon-gamma (IFN-gamma)-dependent protection and synthesis of chemoattractants for mononuclear leucocytes caused by IL-12 in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*." Clin Exp Immunol **117**(1): 113-122.
- Kelly, R. M., J. Chen, et al. (2005). "Opsonic requirements for dendritic cell-mediated responses to *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **73**(1): 592-598.
- Kidd, S. E., P. J. Bach, et al. (2007). "*Cryptococcus gattii* dispersal mechanisms, British Columbia, Canada." Emerg Infect Dis **13**(1): 51-57.



- Kidd, S. E., Y. Chow, et al. (2007). "Characterization of environmental sources of the human and animal pathogen *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada, and the Pacific Northwest of the United States." Appl Environ Microbiol **73**(5): 1433-1443.
- Kidd, S. E., F. Hagen, et al. (2004). "A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada)." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(49): 17258-17263.
- Kim, B. E., T. Nevitt, et al. (2008). "Mechanisms for copper acquisition, distribution and regulation." Nat Chem Biol **4**(3): 176-185.
- Kindt, T. J., R. A. Goldsby, et al. (2007). Kuby immunology. New York, W.H. Freeman.
- Kleinschek, M. A., U. Muller, et al. (2006). "IL-23 enhances the inflammatory cell response in *Cryptococcus neoformans* infection and induces a cytokine pattern distinct from IL-12." J Immunol **176**(2): 1098-1106.
- Kleinschek, M. A., U. Muller, et al. (2010). "Administration of IL-23 engages innate and adaptive immune mechanisms during fungal infection." Int Immunol **22**(2): 81-90.
- Klengel, T., W. J. Liang, et al. (2005). "Fungal adenylyl cyclase integrates CO<sub>2</sub> sensing with cAMP signaling and virulence." Curr Biol **15**(22): 2021-2026.
- Kmetzsch, L., L. S. Joffe, et al. (2011). "Role for Golgi reassembly and stacking protein (GRASP) in polysaccharide secretion and fungal virulence." Mol Microbiol **81**(1): 206-218.
- Kozel, T. R. (1996). "Activation of the complement system by pathogenic fungi." Clin Microbiol Rev **9**(1): 34-46.
- Kozel, T. R., G. S. Pfrommer, et al. (1987). "Activated neutrophils exhibit enhanced phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* opsonized with normal human serum." Clin Exp Immunol **70**(1): 238-246.
- Kozel, T. R., M. A. Wilson, et al. (1991). "Early events in initiation of alternative complement pathway activation by the capsule of *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **59**(9): 3101-3110.
- Kozubowski, L., S. C. Lee, et al. (2009). "Signalling pathways in the pathogenesis of *Cryptococcus*." Cell Microbiol **11**(3): 370-380.
- Kraus, P. R., M. J. Boily, et al. (2004). "Identification of *Cryptococcus neoformans* temperature-regulated genes with a genomic-DNA microarray." Eukaryot Cell **3**(5): 1249-1260.
- Kraus, P. R., C. B. Nichols, et al. (2005). "Calcium- and calcineurin-independent roles for calmodulin in *Cryptococcus neoformans* morphogenesis and high-temperature growth." Eukaryot Cell **4**(6): 1079-1087.
- Kronstad, J. W., R. Attarian, et al. (2011). "Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box." Nat Rev Microbiol **9**(3): 193-203.
- Kwon-Chung, K. J. (1976). "Morphogenesis of *Filobasidiella neoformans*, the sexual state of *Cryptococcus neoformans*." Mycologia **68**(4): 821-833.
- Kwon-Chung, K. J., I. Polacheck, et al. (1982). "Improved diagnostic medium for separation of *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* (serotypes A and D)

- and *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (serotypes B and C)." J Clin Microbiol **15**(3): 535-537.
- Kwon-Chung, K. J. and A. Varma (2006). "Do major species concepts support one, two or more species within *Cryptococcus neoformans*?" FEMS Yeast Res **6**(4): 574-587.
- Lacaz Cda, S., E. M. Heins-Vaccari, et al. (2002). "Primary cutaneous cryptococcosis due to *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* serotype B, in an immunocompetent patient." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **44**(4): 225-228.
- Langfelder, K., M. Streibel, et al. (2003). "Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi." Fungal Genet Biol **38**(2): 143-158.
- Langrish, C. L., Y. Chen, et al. (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-240.
- Latouche, G. N., T. C. Sorrell, et al. (2002). "Isolation and characterisation of the phospholipase B gene of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*." FEMS Yeast Res **2**(4): 551-561.
- Leal, A. L., J. Faganello, et al. (2008). "Epidemiological profile of cryptococcal meningitis patients in Rio Grande do Sul, Brazil." Mycopathologia **166**(2): 71-75.
- Lee, S. C., D. W. Dickson, et al. (1994). "Human astrocytes inhibit *Cryptococcus neoformans* growth by a nitric oxide-mediated mechanism." J Exp Med **180**(1): 365-369.
- Lee, S. C., Y. Kress, et al. (1995). "Human microglia mediate anti-*Cryptococcus neoformans* activity in the presence of specific antibody." J Neuroimmunol **62**(1): 43-52.
- Lee, Y. C., J. T. Wang, et al. (2011). "Comparisons of clinical features and mortality of cryptococcal meningitis between patients with and without human immunodeficiency virus infection." J Microbiol Immunol Infect **44**(5): 338-345.
- Lendvai, N. and A. Casadevall (1999). "Monoclonal antibody-mediated toxicity in *Cryptococcus neoformans* infection: mechanism and relationship to antibody isotype." J Infect Dis **180**(3): 791-801.
- Lengeler, K. B., D. S. Fox, et al. (2002). "Mating-type locus of *Cryptococcus neoformans*: a step in the evolution of sex chromosomes." Eukaryot Cell **1**(5): 704-718.
- Levitz, S. M., S. H. Nong, et al. (1999). "*Cryptococcus neoformans* resides in an acidic phagolysosome of human macrophages." Infect Immun **67**(2): 885-890.
- 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): 479-491.
- Li, S. S. and C. H. Mody (2010). "*Cryptococcus*." Proc Am Thorac Soc **7**(3): 186-196.
- Liappis, A. P., V. L. Kan, et al. (2008). "Mannitol and inflammatory markers in the cerebral spinal fluid of HIV-infected patients with cryptococcal meningitis." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **27**(6): 477-479.
- Lin, X. (2009). "*Cryptococcus neoformans*: morphogenesis, infection, and evolution." Infect Genet Evol **9**(4): 401-416.

- Lin, X. and J. Heitman (2006). "The biology of the *Cryptococcus neoformans* species complex." Annu Rev Microbiol **60**: 69-105.
- Lin, X., C. M. Hull, et al. (2005). "Sexual reproduction between partners of the same mating type in *Cryptococcus neoformans*." Nature **434**(7036): 1017-1021.
- Lindberg, J., F. Hagen, et al. (2007). "*Cryptococcus gattii* risk for tourists visiting Vancouver Island, Canada." Emerg Infect Dis **13**(1): 178-179.
- Lindell, D. M., M. N. Ballinger, et al. (2006). "Immunologic homeostasis during infection: coexistence of strong pulmonary cell-mediated immunity to secondary *Cryptococcus neoformans* infection while the primary infection still persists at low levels in the lungs." J Immunol **177**(7): 4652-4661.
- Lindell, D. M., T. A. Moore, et al. (2005). "Generation of antifungal effector CD8+ T cells in the absence of CD4+ T cells during *Cryptococcus neoformans* infection." J Immunol **174**(12): 7920-7928.
- Lindell, D. M., T. A. Moore, et al. (2006). "Distinct compartmentalization of CD4+ T-cell effector function versus proliferative capacity during pulmonary cryptococcosis." Am J Pathol **168**(3): 847-855.
- Lipovsky, M. M., G. Gekker, et al. (1998). "Cryptococcal glucuronoxylomannan induces interleukin (IL)-8 production by human microglia but inhibits neutrophil migration toward IL-8." J Infect Dis **177**(1): 260-263.
- Lipovsky, M. M., A. E. Juliana, et al. (1998). "Effect of cytokines on anticryptococcal activity of human microglial cells." Clin Diagn Lab Immunol **5**(3): 410-411.
- Litvintseva, A. P., I. Carbone, et al. (2011). "Evidence that the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* may have evolved in Africa." PLoS One **6**(5): e19688.
- Litvintseva, A. P., L. Kestenbaum, et al. (2005). "Comparative analysis of environmental and clinical populations of *Cryptococcus neoformans*." J Clin Microbiol **43**(2): 556-564.
- Litvintseva, A. P., R. E. Marra, et al. (2003). "Evidence of sexual recombination among *Cryptococcus neoformans* serotype A isolates in sub-Saharan Africa." Eukaryot Cell **2**(6): 1162-1168.
- Litvintseva, A. P. and T. G. Mitchell (2009). "Most environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (serotype A) are not lethal for mice." Infect Immun **77**(8): 3188-3195.
- Liu, G. Y. and V. Nizet (2009). "Color me bad: microbial pigments as virulence factors." Trends Microbiol **17**(9): 406-413.
- Liu, L., R. P. Tewari, et al. (1999). "Laccase protects *Cryptococcus neoformans* from antifungal activity of alveolar macrophages." Infect Immun **67**(11): 6034-6039.
- Liu, P. Y., Y. Yang, et al. (2009). "Cryptococcal liver abscess: a case report of successful treatment with amphotericin-B and literature review." Jpn J Infect Dis **62**(1): 59-60.
- Loftus, B. J., E. Fung, et al. (2005). "The genome of the basidiomycetous yeast and human pathogen *Cryptococcus neoformans*." Science **307**(5713): 1321-1324.

- London, R., B. S. Orozco, et al. (2006). "The pursuit of cryptococcal pathogenesis: heterologous hosts and the study of cryptococcal host-pathogen interactions." FEMS Yeast Res **6**(4): 567-573.
- Lortholary, O., L. Improvisi, et al. (2002). "Influence of gender and age on course of infection and cytokine responses in mice with disseminated *Cryptococcus neoformans* infection." Clin Microbiol Infect **8**(1): 31-37.
- Lortholary, O., L. Improvisi, et al. (1999). "Cytokine profiles of AIDS patients are similar to those of mice with disseminated *Cryptococcus neoformans* infection." Infect Immun **67**(12): 6314-6320.
- Lortholary, O., K. Sitbon, et al. (2005). "Evidence for human immunodeficiency virus and *Cryptococcus neoformans* interactions in the pro-inflammatory and anti-inflammatory responses in blood during AIDS-associated cryptococcosis." Clin Microbiol Infect **11**(4): 296-300.
- Luo, Y. and A. Casadevall (2010). "Intracellular cryptococci suppress Fc-mediated cyclin D1 elevation." Commun Integr Biol **3**(4): 390-391.
- Luo, Y., B. M. Isaac, et al. (2009). "Phagocytosis inhibits F-actin-enriched membrane protrusions stimulated by fractalkine (CX3CL1) and colony-stimulating factor 1." Infect Immun **77**(10): 4487-4495.
- Lupo, P., Y. C. Chang, et al. (2008). "The presence of capsule in *Cryptococcus neoformans* influences the gene expression profile in dendritic cells during interaction with the fungus." Infect Immun **76**(4): 1581-1589.
- Ma, H., J. E. Croudace, et al. (2006). "Expulsion of live pathogenic yeast by macrophages." Curr Biol **16**(21): 2156-2160.
- Ma, H., J. E. Croudace, et al. (2007). "Direct cell-to-cell spread of a pathogenic yeast." BMC Immunol **8**: 15.
- Ma, H. and R. C. May (2010). "Mitochondria and the regulation of hypervirulence in the fatal fungal outbreak on Vancouver Island." Virulence **1**(3): 197-201.
- Ma, L. L., J. C. Spurrell, et al. (2002). "CD8 T cell-mediated killing of *Cryptococcus neoformans* requires granulysin and is dependent on CD4 T cells and IL-15." J Immunol **169**(10): 5787-5795.
- Ma, L. L., C. L. Wang, et al. (2004). "NK cells use perforin rather than granulysin for anticryptococcal activity." J Immunol **173**(5): 3357-3365.
- MacDougall, L. and M. Fyfe (2006). "Emergence of *Cryptococcus gattii* in a novel environment provides clues to its incubation period." J Clin Microbiol **44**(5): 1851-1852.
- MacDougall, L., M. Fyfe, et al. (2011). "Risk factors for *Cryptococcus gattii* infection, British Columbia, Canada." Emerg Infect Dis **17**(2): 193-199.
- Macura, N., T. Zhang, et al. (2007). "Dependence of macrophage phagocytic efficacy on antibody concentration." Infect Immun **75**(4): 1904-1915.
- Mak, S., B. Klinkenberg, et al. (2010). "Ecological niche modeling of *Cryptococcus gattii* in British Columbia, Canada." Environ Health Perspect **118**(5): 653-658.
- Mambula, S. S., E. R. Simons, et al. (2000). "Human neutrophil-mediated nonoxidative antifungal activity against *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **68**(11): 6257-6264.

- Manfredi, R., L. Calza, et al. (2003). "AIDS-associated Cryptococcus infection before and after the highly active antiretroviral therapy era: emerging management problems." Int J Antimicrob Agents **22**(4): 449-452.
- Mangino, G., Z. A. Percario, et al. (2011). "HIV-1 Nef induces proinflammatory state in macrophages through its acidic cluster domain: involvement of TNF alpha receptor associated factor 2." PLoS One **6**(8): e22982.
- Mansour, M. K., E. Latz, et al. (2006). "Cryptococcus neoformans glycoantigens are captured by multiple lectin receptors and presented by dendritic cells." J Immunol **176**(5): 3053-3061.
- Mansour, M. K., L. S. Schlesinger, et al. (2002). "Optimal T cell responses to Cryptococcus neoformans mannoprotein are dependent on recognition of conjugated carbohydrates by mannose receptors." J Immunol **168**(6): 2872-2879.
- Mariano Andrade, R., G. Monteiro Almeida, et al. (2003). "Glucuronoxylomannan of Cryptococcus neoformans exacerbates in vitro yeast cell growth by interleukin 10-dependent inhibition of CD4+ T lymphocyte responses." Cell Immunol **222**(2): 116-125.
- 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): 2382-2391.
- Marr, K. J., G. J. Jones, et al. (2006). "Contemplating the murine test tube: lessons from natural killer cells and Cryptococcus neoformans." FEMS Yeast Res **6**(4): 543-557.
- Marr, K. J., G. J. Jones, et al. (2009). "Cryptococcus neoformans directly stimulates perforin production and rearms NK cells for enhanced anticryptococcal microbicidal activity." Infect Immun **77**(6): 2436-2446.
- McClelland, C. M., Y. C. Chang, et al. (2004). "Uniqueness of the mating system in Cryptococcus neoformans." Trends Microbiol **12**(5): 208-212.
- McClelland, E. E., A. M. Nicola, et al. (2010). "Ab binding alters gene expression in Cryptococcus neoformans and directly modulates fungal metabolism." J Clin Invest **120**(4): 1355-1361.
- Mednick, A. J., M. Feldmesser, et al. (2003). "Neutropenia alters lung cytokine production in mice and reduces their susceptibility to pulmonary cryptococcosis." Eur J Immunol **33**(6): 1744-1753.
- Mednick, A. J., J. D. Nosanchuk, et al. (2005). "Melanization of Cryptococcus neoformans affects lung inflammatory responses during cryptococcal infection." Infect Immun **73**(4): 2012-2019.
- Megson, G. M., D. A. Stevens, et al. (1996). "D-mannitol in cerebrospinal fluid of patients with AIDS and cryptococcal meningitis." J Clin Microbiol **34**(1): 218-221.
- Merkel, G. J. and B. A. Scofield (1997). "The in vitro interaction of Cryptococcus neoformans with human lung epithelial cells." FEMS Immunol Med Microbiol **19**(3): 203-213.

- Mershon-Shier, K. L., A. Vasuthasawat, et al. (2011). "In vitro C3 deposition on Cryptococcus capsule occurs via multiple complement activation pathways." Mol Immunol **48**(15-16): 2009-2018.
- Mershon, K. L., A. Vasuthasawat, et al. (2009). "Role of complement in protection against Cryptococcus gattii infection." Infect Immun **77**(3): 1061-1070.
- Mitchell, A. P. (2006). "Cryptococcal virulence: beyond the usual suspects." J Clin Invest **116**(6): 1481-1483.
- Mitchell, T. G. and J. R. Perfect (1995). "Cryptococcosis in the era of AIDS--100 years after the discovery of Cryptococcus neoformans." Clin Microbiol Rev **8**(4): 515-548.
- Mody, C. H., R. Paine, 3rd, et al. (1994). "CD8 cells play a critical role in delayed type hypersensitivity to intact Cryptococcus neoformans." J Immunol **152**(8): 3970-3979.
- Molez, J. F. (1998). "The historical question of acquired immunodeficiency syndrome in the 1960s in the Congo River basin area in relation to cryptococcal meningitis." Am J Trop Med Hyg **58**(3): 273-276.
- Monari, C., F. Bistoni, et al. (2006). "Glucuronoxylomannan exhibits potent immunosuppressive properties." FEMS Yeast Res **6**(4): 537-542.
- Monari, C., A. Casadevall, et al. (1999). "Neutrophils from patients with advanced human immunodeficiency virus infection have impaired complement receptor function and preserved Fc $\gamma$  receptor function." J Infect Dis **180**(5): 1542-1549.
- Monari, C., T. R. Kozel, et al. (2002). "Modulation of C5aR expression on human neutrophils by encapsulated and acapsular Cryptococcus neoformans." Infect Immun **70**(7): 3363-3370.
- Moranova, Z., S. Kawamoto, et al. (2009). "Hypoxia sensing in cryptococcus neoformans: biofilm-like adaptation for dormancy?" Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub **153**(3): 189-193.
- Morgan, J., K. M. McCarthy, et al. (2006). "Cryptococcus gattii infection: characteristics and epidemiology of cases identified in a South African province with high HIV seroprevalence, 2002-2004." Clin Infect Dis **43**(8): 1077-1080.
- Morschhauser, J. (2010). "Regulation of multidrug resistance in pathogenic fungi." Fungal Genet Biol **47**(2): 94-106.
- 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): 5367-5377.
- Murphy, J. W., F. Schafer, et al. (1998). "Antigen-induced protective and nonprotective cell-mediated immune components against Cryptococcus neoformans." Infect Immun **66**(6): 2632-2639.
- Murphy, J. W., A. Zhou, et al. (1997). "Direct interactions of human natural killer cells with Cryptococcus neoformans inhibit granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha production." Infect Immun **65**(11): 4564-4571.

- Mylonakis, E., F. M. Ausubel, et al. (2002). "Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Cryptococcus neoformans* as a model of yeast pathogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15675-15680.
- Nakamura, K., K. Miyagi, et al. (2006). "Limited contribution of Toll-like receptor 2 and 4 to the host response to a fungal infectious pathogen, *Cryptococcus neoformans*." FEMS Immunol Med Microbiol **47**(1): 148-154.
- Nakamura, K., A. Miyazato, et al. (2008). "Deoxynucleic acids from *Cryptococcus neoformans* activate myeloid dendritic cells via a TLR9-dependent pathway." J Immunol **180**(6): 4067-4074.
- Nanno, M., T. Shiohara, et al. (2007). "gammadelta T cells: firefighters or fire boosters in the front lines of inflammatory responses." Immunol Rev **215**: 103-113.
- Narasipura, S. D., J. G. Ault, et al. (2003). "Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans* var. *gattii*: role in biology and virulence." Mol Microbiol **47**(6): 1681-1694.
- Nathan, C. and A. Ding (2010). "Nonresolving inflammation." Cell **140**(6): 871-882.
- Nessa, K., N. T. Gross, et al. (1997). "In vivo interaction between alveolar macrophages and *Cryptococcus neoformans*." Mycopathologia **139**(1): 1-7.
- Netea, M. G., G. Ferwerda, et al. (2006). "Recognition of fungal pathogens by toll-like receptors." Curr Pharm Des **12**(32): 4195-4201.
- Netea, M. G., C. Van der Graaf, et al. (2004). "Recognition of fungal pathogens by Toll-like receptors." Eur J Clin Microbiol Infect Dis **23**(9): 672-676.
- Netski, D. and T. R. Kozel (2002). "Fc-dependent and Fc-independent opsonization of *Cryptococcus neoformans* by anticapsular monoclonal antibodies: importance of epitope specificity." Infect Immun **70**(6): 2812-2819.
- Ngamskulrunroj, P., U. Himmelreich, et al. (2009). "The trehalose synthesis pathway is an integral part of the virulence composite for *Cryptococcus gattii*." Infect Immun **77**(10): 4584-4596.
- Ngamskulrunroj, P., C. Serena, et al. (2011). "Global VGIIa isolates are of comparable virulence to the major fatal *Cryptococcus gattii* Vancouver Island outbreak genotype." Clin Microbiol Infect **17**(2): 251-258.
- Nichols, C. B., Z. H. Perfect, et al. (2007). "A Ras1-Cdc24 signal transduction pathway mediates thermotolerance in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*." Mol Microbiol **63**(4): 1118-1130.
- Nicola, A. M., E. J. Robertson, et al. (2011). "Nonlytic Exocytosis of *Cryptococcus neoformans* from Macrophages Occurs In Vivo and Is Influenced by Phagosomal pH." MBio **2**(4).
- Nielsen, K., G. M. Cox, et al. (2005). "*Cryptococcus neoformans* {alpha} strains preferentially disseminate to the central nervous system during coinfection." Infect Immun **73**(8): 4922-4933.
- Nielsen, K., G. M. Cox, et al. (2003). "Sexual cycle of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* and virulence of congenic alpha and alpha isolates." Infect Immun **71**(9): 4831-4841.
- Nielsen, K., A. L. De Obaldia, et al. (2007). "*Cryptococcus neoformans* mates on pigeon guano: implications for the realized ecological niche and globalization." Eukaryot Cell **6**(6): 949-959.

- Nosanchuk, J. D., A. L. Rosas, et al. (2000). "Melanisation of *Cryptococcus neoformans* in human brain tissue." *Lancet* **355**(9220): 2049-2050.
- Noverr, M. C., G. M. Cox, et al. (2003). "Role of PLB1 in pulmonary inflammation and cryptococcal eicosanoid production." *Infect Immun* **71**(3): 1538-1547.
- Noverr, M. C., S. M. Phare, et al. (2001). "Pathogenic yeasts *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans* produce immunomodulatory prostaglandins." *Infect Immun* **69**(5): 2957-2963.
- Noverr, M. C., P. R. Williamson, et al. (2004). "CNLAC1 is required for extrapulmonary dissemination of *Cryptococcus neoformans* but not pulmonary persistence." *Infect Immun* **72**(3): 1693-1699.
- O'Meara, T. R., C. Hay, et al. (2010). "*Cryptococcus neoformans* histone acetyltransferase Gcn5 regulates fungal adaptation to the host." *Eukaryot Cell* **9**(8): 1193-1202.
- Odom, A., S. Muir, et al. (1997). "Calcineurin is required for virulence of *Cryptococcus neoformans*." *EMBO J* **16**(10): 2576-2589.
- Okabayashi, K., A. Hasegawa, et al. (2007). "Microreview: capsule-associated genes of *Cryptococcus neoformans*." *Mycopathologia* **163**(1): 1-8.
- Okagaki, L. H., A. K. Strain, et al. (2010). "Cryptococcal cell morphology affects host cell interactions and pathogenicity." *PLoS Pathog* **6**(6): e1000953.
- Okagaki, L. H., Y. Wang, et al. (2011). "Cryptococcal titan cell formation is regulated by G-protein signaling in response to multiple stimuli." *Eukaryot Cell*.
- Oliveira, D. L., C. G. Freire-de-Lima, et al. (2010). "Extracellular vesicles from *Cryptococcus neoformans* modulate macrophage functions." *Infect Immun* **78**(4): 1601-1609.
- 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): 1716-1727.
- Olszewski, M. A., G. B. Huffnagle, et al. (2000). "The role of macrophage inflammatory protein-1 alpha/CCL3 in regulation of T cell-mediated immunity to *Cryptococcus neoformans* infection." *J Immunol* **165**(11): 6429-6436.
- Olszewski, M. A., G. B. Huffnagle, et al. (2001). "Regulatory effects of macrophage inflammatory protein 1alpha/CCL3 on the development of immunity to *Cryptococcus neoformans* depend on expression of early inflammatory cytokines." *Infect Immun* **69**(10): 6256-6263.
- Olszewski, M. A., M. C. Noverr, et al. (2004). "Urease expression by *Cryptococcus neoformans* promotes microvascular sequestration, thereby enhancing central nervous system invasion." *Am J Pathol* **164**(5): 1761-1771.
- Osterholzer, J. J., G. H. Chen, et al. (2011). "Chemokine receptor 2-mediated accumulation of fungicidal exudate macrophages in mice that clear cryptococcal lung infection." *Am J Pathol* **178**(1): 198-211.
- Osterholzer, J. J., J. L. Curtis, et al. (2008). "CCR2 mediates conventional dendritic cell recruitment and the formation of bronchovascular mononuclear cell



- infiltrates in the lungs of mice infected with *Cryptococcus neoformans*." J Immunol **181**(1): 610-620.
- Osterholzer, J. J., J. E. Milam, et al. (2009). "Role of dendritic cells and alveolar macrophages in regulating early host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **77**(9): 3749-3758.
- Osterholzer, J. J., R. Surana, et al. (2009). "Cryptococcal urease promotes the accumulation of immature dendritic cells and a non-protective T2 immune response within the lung." Am J Pathol **174**(3): 932-943.
- Oykhman, P. and C. H. Mody (2010). "Direct microbicidal activity of cytotoxic T-lymphocytes." J Biomed Biotechnol **2010**: 249482.
- Palmer, G. E., D. S. Askew, et al. (2008). "The diverse roles of autophagy in medically important fungi." Autophagy **4**(8): 982-988.
- Pappalardo, M. C. and M. S. Melhem (2003). "Cryptococcosis: a review of the Brazilian experience for the disease." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **45**(6): 299-305.
- Park, B. J., K. A. Wannemuehler, et al. (2009). "Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS." AIDS **23**(4): 525-530.
- 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): 821-832.
- Perfect, J. R. (2006). "Cryptococcus neoformans: the yeast that likes it hot." FEMS Yeast Res **6**(4): 463-468.
- Pericolini, E., E. Cenci, et al. (2006). "Cryptococcus neoformans capsular polysaccharide component galactoxylomannan induces apoptosis of human T-cells through activation of caspase-8." Cell Microbiol **8**(2): 267-275.
- Petkovic, L., V. A. Arsenijevic, et al. (2010). "Anticryptococcal cytotoxicity of murine nonadherent cells is perforin and nonperforin mediated." Mycologia **102**(3): 552-559.
- Pfaller, M. A. and D. J. Diekema (2010). "Epidemiology of invasive mycoses in North America." Crit Rev Microbiol **36**(1): 1-53.
- Phillips, P., K. Chapman, et al. (2009). "Dexamethasone in *Cryptococcus gattii* central nervous system infection." Clin Infect Dis **49**(4): 591-595.
- Piehler, D., W. Stenzel, et al. (2011). "Eosinophils contribute to IL-4 production and shape the T-helper cytokine profile and inflammatory response in pulmonary cryptococcosis." Am J Pathol **179**(2): 733-744.
- Pietrella, D., C. Corbucci, et al. (2005). "Mannoproteins from *Cryptococcus neoformans* promote dendritic cell maturation and activation." Infect Immun **73**(2): 820-827.
- Pietrella, D., B. Fries, et al. (2003). "Phenotypic switching of *Cryptococcus neoformans* can influence the outcome of the human immune response." Cell Microbiol **5**(8): 513-522.
- Pietrella, D., T. R. Kozel, et al. (2001). "Interleukin-12 counterbalances the deleterious effect of human immunodeficiency virus type 1 envelope

- glycoprotein gp120 on the immune response to *Cryptococcus neoformans*." J Infect Dis **183**(1): 51-58.
- Pietrella, D., P. Lupo, et al. (2004). "An early imbalance of interleukin 12 influences the adjuvant effect of mannoproteins of *Cryptococcus neoformans*." Cell Microbiol **6**(9): 883-891.
- Pietrella, D., P. Lupo, et al. (2004). "Disruption of CD40/CD40L interaction influences the course of *Cryptococcus neoformans* infection." FEMS Immunol Med Microbiol **40**(1): 63-70.
- Pietrella, D., C. Monari, et al. (1999). "HIV type 1 envelope glycoprotein gp120 induces development of a T helper type 2 response to *Cryptococcus neoformans*." AIDS **13**(16): 2197-2207.
- Pietrella, D., S. Perito, et al. (2001). "Cytotoxic T lymphocyte antigen costimulation influences T-cell activation in response to *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **69**(3): 1508-1514.
- Pirofski, L. A. (2001). "Polysaccharides, mimotopes and vaccines for fungal and encapsulated pathogens." Trends Microbiol **9**(9): 445-451.
- Pitzurra, L., S. Perito, et al. (2003). "Humoral response against *Cryptococcus neoformans* mannoprotein antigens in HIV-infected patients." Clin Exp Immunol **133**(1): 91-96.
- Polyak, S., H. Chen, et al. (1997). "Impaired class II expression and antigen uptake in monocytic cells after HIV-1 infection." J Immunol **159**(5): 2177-2188.
- Poudrier, J., X. Weng, 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): 11733-11744.
- Priceputu, E., I. Rodrigue, et al. (2005). "The Nef-mediated AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with increased Fas/FasL expression on T cells and T-cell death but is not prevented in Fas-, FasL-, tumor necrosis factor receptor 1-, or interleukin-1beta-converting enzyme-deficient or Bcl2-expressing transgenic mice." J Virol **79**(10): 6377-6391.
- Pugliese, A., V. Vidotto, et al. (2005). "Phagocytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection." Clin Diagn Lab Immunol **12**(8): 889-895.
- Pukkila-Worley, R. and J. A. Alspaugh (2004). "Cyclic AMP signaling in *Cryptococcus neoformans*." FEMS Yeast Res **4**(4-5): 361-367.
- Pukkila-Worley, R. and E. Mylonakis (2008). "Epidemiology and management of cryptococcal meningitis: developments and challenges." Expert Opin Pharmacother **9**(4): 551-560.
- Qin, Q. M., J. Luo, et al. (2011). "Functional analysis of host factors that mediate the intracellular lifestyle of *Cryptococcus neoformans*." PLoS Pathog **7**(6): e1002078.
- Qureshi, A., M. Subathra, et al. (2010). "Role of sphingomyelin synthase in controlling the antimicrobial activity of neutrophils against *Cryptococcus neoformans*." PLoS One **5**(12): e15587.

- Qureshi, M. H., T. Zhang, et al. (1999). "Combined effects of IL-12 and IL-18 on the clinical course and local cytokine production in murine pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*." Eur J Immunol **29**(2): 643-649.
- Retini, C., T. R. Kozel, et al. (2001). "Interdependency of interleukin-10 and interleukin-12 in regulation of T-cell differentiation and effector function of monocytes in response to stimulation with *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **69**(10): 6064-6073.
- Reynolds, T. B. (2009). "Strategies for acquiring the phospholipid metabolite inositol in pathogenic bacteria, fungi and protozoa: making it and taking it." Microbiology **155**(Pt 5): 1386-1396.
- Rhodes, J. C., L. S. Wicker, et al. (1980). "Genetic control of susceptibility to *Cryptococcus neoformans* in mice." Infect Immun **29**(2): 494-499.
- Rhome, R., T. McQuiston, et al. (2007). "Biosynthesis and immunogenicity of glucosylceramide in *Cryptococcus neoformans* and other human pathogens." Eukaryot Cell **6**(10): 1715-1726.
- Ritter, M. and D. L. Goldman (2009). "Pharmacotherapy of cryptococcosis." Expert Opin Pharmacother **10**(15): 2433-2443.
- Rittershaus, P. C., T. B. Kechichian, et al. (2006). "Glucosylceramide synthase is an essential regulator of pathogenicity of *Cryptococcus neoformans*." J Clin Invest **116**(6): 1651-1659.
- Rivera, J., J. Mukherjee, et al. (2002). "Antibody efficacy in murine pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection: a role for nitric oxide." J Immunol **168**(7): 3419-3427.
- Rivera, J., O. Zaragoza, et al. (2005). "Antibody-mediated protection against *Cryptococcus neoformans* pulmonary infection is dependent on B cells." Infect Immun **73**(2): 1141-1150.
- Robertson, E. J. and A. Casadevall (2009). "Antibody-mediated immobilization of *Cryptococcus neoformans* promotes biofilm formation." Appl Environ Microbiol **75**(8): 2528-2533.
- Rodrigues, A. R., N. Heise, et al. (2005). "B cell response during infection with the MAT a and MAT alpha mating types of *Cryptococcus neoformans*." Microbes Infect **7**(1): 118-125.
- Rodrigues, M. L., E. S. Nakayasu, et al. (2008). "Extracellular vesicles produced by *Cryptococcus neoformans* contain protein components associated with virulence." Eukaryot Cell **7**(1): 58-67.
- Rodrigues, M. L., L. Nimrichter, et al. (2007). "Vesicular polysaccharide export in *Cryptococcus neoformans* is a eukaryotic solution to the problem of fungal trans-cell wall transport." Eukaryot Cell **6**(1): 48-59.
- Rosario, I., M. Hermoso de Mendoza, et al. (2005). "Isolation of *Cryptococcus* species including *C. neoformans* from cloaca of pigeons." Mycoses **48**(6): 421-424.
- Rosas, A. L. and A. Casadevall (2001). "Melanization decreases the susceptibility of *Cryptococcus neoformans* to enzymatic degradation." Mycopathologia **151**(2): 53-56.
- Rosas, A. L., R. S. MacGill, et al. (2002). "Activation of the alternative complement pathway by fungal melanins." Clin Diagn Lab Immunol **9**(1): 144-148.

- Rosas, A. L., J. D. Nosanchuk, et al. (2001). "Passive immunization with melanin-binding monoclonal antibodies prolongs survival of mice with lethal *Cryptococcus neoformans* infection." *Infect Immun* **69**(5): 3410-3412.
- Salkowski, C. A. and E. Balish (1991). "Role of natural killer cells in resistance to systemic cryptococcosis." *J Leukoc Biol* **50**(2): 151-159.
- Santangelo, R., H. Zoellner, et al. (2004). "Role of extracellular phospholipases and mononuclear phagocytes in dissemination of cryptococcosis in a murine model." *Infect Immun* **72**(4): 2229-2239.
- Santangelo, R. T., M. H. Nouri-Sorkhabi, et al. (1999). "Biochemical and functional characterisation of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state." *J Med Microbiol* **48**(8): 731-740.
- Saul, N., M. Krockenberger, et al. (2008). "Evidence of recombination in mixed-mating-type and alpha-only populations of *Cryptococcus gattii* sourced from single eucalyptus tree hollows." *Eukaryot Cell* **7**(4): 727-734.
- Schop, J. (2007). "Protective immunity against *Cryptococcus neoformans* infection." *Mcgill J Med* **10**(1): 35-43.
- Seider, K., A. Heyken, et al. (2010). "Interaction of pathogenic yeasts with phagocytes: survival, persistence and escape." *Curr Opin Microbiol* **13**(4): 392-400.
- Serbina, N. V., T. Jia, et al. (2008). "Monocyte-mediated defense against microbial pathogens." *Annu Rev Immunol* **26**: 421-452.
- Severo, C. B., A. F. Gazzoni, et al. (2009). "Chapter 3--pulmonary cryptococcosis." *J Bras Pneumol* **35**(11): 1136-1144.
- Severo, C. B., M. O. Xavier, et al. (2009). "Cryptococcosis in children." *Paediatr Respir Rev* **10**(4): 166-171.
- Shankar, S. K., A. Mahadevan, et al. (2007). "Pathobiology of fungal infections of the central nervous system with special reference to the Indian scenario." *Neurol India* **55**(3): 198-215.
- Shao, X., J. Rivera, et al. (2005). "A dual role for TGF-beta1 in the control and persistence of fungal pneumonia." *J Immunol* **175**(10): 6757-6763.
- Shea, J. M., J. L. Henry, et al. (2006). "Lipid metabolism in *Cryptococcus neoformans*." *FEMS Yeast Res* **6**(4): 469-479.
- Shen, C. C., W. Y. Cheng, et al. (2006). "Isolated intramedullary cryptococcal granuloma of the conus medullaris: case report and review of the literature." *Scand J Infect Dis* **38**(6-7): 562-565.
- Shi, M., S. S. Li, et al. (2010). "Real-time imaging of trapping and urease-dependent transmigration of *Cryptococcus neoformans* in mouse brain." *J Clin Invest* **120**(5): 1683-1693.
- Shibuya, K., A. Hirata, et al. (2005). "Granuloma and cryptococcosis." *J Infect Chemother* **11**(3): 115-122.
- Shirley, R. M. and J. W. Baddley (2009). "Cryptococcal lung disease." *Curr Opin Pulm Med* **15**(3): 254-260.
- Shoham, S., C. Huang, et al. (2001). "Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF-alpha release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule." *J Immunol* **166**(7): 4620-4626.

- Siafakas, A. R., T. C. Sorrell, et al. (2007). "Cell wall-linked cryptococcal phospholipase B1 is a source of secreted enzyme and a determinant of cell wall integrity." J Biol Chem **282**(52): 37508-37514.
- Siafakas, A. R., L. C. Wright, et al. (2006). "Lipid rafts in *Cryptococcus neoformans* concentrate the virulence determinants phospholipase B1 and Cu/Zn superoxide dismutase." Eukaryot Cell **5**(3): 488-498.
- Siddiqui, A. A., A. E. Brouwer, et al. (2005). "IFN-gamma at the site of infection determines rate of clearance of infection in cryptococcal meningitis." J Immunol **174**(3): 1746-1750.
- Siegemund, S. and G. Alber (2008). "Cryptococcus neoformans activates bone marrow-derived conventional dendritic cells rather than plasmacytoid dendritic cells and down-regulates macrophages." FEMS Immunol Med Microbiol **52**(3): 417-427.
- Singh, A., A. Qureshi, et al. (2011). "Quantitation of cellular components in *Cryptococcus neoformans* for system biology analysis." Methods Mol Biol **734**: 317-333.
- Singh, C. S., M. Rahman, et al. (2007). "Cholecystitis as the initial manifestation of disseminated cryptococcosis." AIDS **21**(15): 2111-2112.
- Sionov, E., H. Lee, et al. (2010). "Cryptococcus neoformans overcomes stress of azole drugs by formation of disomy in specific multiple chromosomes." PLoS Pathog **6**(4): e1000848.
- Snelgrove, R. J., L. Edwards, et al. (2006). "In the absence of reactive oxygen species, T cells default to a Th1 phenotype and mediate protection against pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection." J Immunol **177**(8): 5509-5516.
- Song, X., S. Shapiro, et al. (2002). "Fcgamma receptor I- and III-mediated macrophage inflammatory protein 1alpha induction in primary human and murine microglia." Infect Immun **70**(9): 5177-5184.
- Sorrell, T. C. (2001). "Cryptococcus neoformans variety gattii." Med Mycol **39**(2): 155-168.
- Sorrell, T. C. and D. H. Ellis (1997). "Ecology of *Cryptococcus neoformans*." Rev Iberoam Micol **14**(2): 42-43.
- Springer, D. J. and V. Chaturvedi (2010). "Projecting global occurrence of *Cryptococcus gattii*." Emerg Infect Dis **16**(1): 14-20.
- Springer, D. J., P. Ren, et al. (2010). "Extracellular fibrils of pathogenic yeast *Cryptococcus gattii* are important for ecological niche, murine virulence and human neutrophil interactions." PLoS One **5**(6): e10978.
- Stano, P., V. Williams, et al. (2009). "App1: an antiphagocytic protein that binds to complement receptors 3 and 2." J Immunol **182**(1): 84-91.
- Steenbergen, J. N., H. A. Shuman, et al. (2001). "Cryptococcus neoformans interactions with amoebae suggest an explanation for its virulence and intracellular pathogenic strategy in macrophages." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(26): 15245-15250.
- Stenzel, W., U. Muller, et al. (2009). "IL-4/IL-13-dependent alternative activation of macrophages but not microglial cells is associated with uncontrolled cerebral cryptococcosis." Am J Pathol **174**(2): 486-496.

- Subramaniam, K., B. Metzger, et al. (2009). "IgM(+) memory B cell expression predicts HIV-associated cryptococcosis status." *J Infect Dis* **200**(2): 244-251.
- Subramaniam, K. S., K. Datta, et al. (2010). "Improved survival of mice deficient in secretory immunoglobulin M following systemic infection with *Cryptococcus neoformans*." *Infect Immun* **78**(1): 441-452.
- Subramanian, S. and D. Mathai (2005). "Clinical manifestations and management of cryptococcal infection." *J Postgrad Med* **51 Suppl 1**: S21-26.
- Sukroongreung, S., S. Lim, et al. (2001). "Phenotypic switching and genetic diversity of *Cryptococcus neoformans*." *J Clin Microbiol* **39**(6): 2060-2064.
- Suvarna, K., A. Bartiss, et al. (2000). "Mannitol-1-phosphate dehydrogenase from *Cryptococcus neoformans* is a zinc-containing long-chain alcohol/polyol dehydrogenase." *Microbiology* **146 ( Pt 10)**: 2705-2713.
- Swingler, S., B. Brichacek, et al. (2003). "HIV-1 Nef intersects the macrophage CD40L signalling pathway to promote resting-cell infection." *Nature* **424**(6945): 213-219.
- Swingler, S., A. Mann, et al. (1999). "HIV-1 Nef mediates lymphocyte chemotaxis and activation by infected macrophages." *Nat Med* **5**(9): 997-103.
- Syme, R. M., J. C. Spurrell, et al. (2002). "Primary dendritic cells phagocytose *Cryptococcus neoformans* via mannose receptors and Fc $\gamma$  receptor II for presentation to T lymphocytes." *Infect Immun* **70**(11): 5972-5981.
- Taborda, C. P. and A. Casadevall (2002). "CR3 (CD11b/CD18) and CR4 (CD11c/CD18) are involved in complement-independent antibody-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans*." *Immunity* **16**(6): 791-802.
- Tang, R. J., J. Breger, et al. (2005). "Cryptococcus neoformans gene involved in mammalian pathogenesis identified by a *Caenorhabditis elegans* progeny-based approach." *Infect Immun* **73**(12): 8219-8225.
- Tascini, C., A. Vecchiarelli, et al. (1999). "Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and fluconazole enhance anti-cryptococcal activity of monocytes from AIDS patients." *AIDS* **13**(1): 49-55.
- Toffaletti, D. L., M. Del Poeta, et al. (2003). "Regulation of cytochrome c oxidase subunit 1 (COX1) expression in *Cryptococcus neoformans* by temperature and host environment." *Microbiology* **149**(Pt 4): 1041-1049.
- Traynor, T. R., A. C. Herring, et al. (2002). "Differential roles of CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 in the development of T1 immunity." *J Immunol* **168**(9): 4659-4666.
- Traynor, T. R., W. A. Kuziel, et al. (2000). "CCR2 expression determines T1 versus T2 polarization during pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection." *J Immunol* **164**(4): 2021-2027.
- Tsai, H. and L. A. Bobek (1998). "Human salivary histatins: promising anti-fungal therapeutic agents." *Crit Rev Oral Biol Med* **9**(4): 480-497.
- Tucker, S. C. and A. Casadevall (2002). "Replication of *Cryptococcus neoformans* in macrophages is accompanied by phagosomal permeabilization and accumulation of vesicles containing polysaccharide in the cytoplasm." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(5): 3165-3170.
- Ueno, H., A. K. Palucka, et al. (2010). "The expanding family of dendritic cell subsets." *Nat Biotechnol* **28**(8): 813-815.

- Uezu, K., K. Kawakami, et al. (2004). "Accumulation of gammadelta T cells in the lungs and their regulatory roles in Th1 response and host defense against pulmonary infection with *Cryptococcus neoformans*." J Immunol **172**(12): 7629-7634.
- Urban, C. F., S. Lourido, et al. (2006). "How do microbes evade neutrophil killing?" Cell Microbiol **8**(11): 1687-1696.
- Vallim, M. A., C. B. Nichols, et al. (2005). "A Rac homolog functions downstream of Ras1 to control hyphal differentiation and high-temperature growth in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*." Eukaryot Cell **4**(6): 1066-1078.
- van Asbeck, E. C., A. I. Hoepelman, et al. (2008). "Mannose binding lectin plays a crucial role in innate immunity against yeast by enhanced complement activation and enhanced uptake of polymorphonuclear cells." BMC Microbiol **8**: 229.
- Vanbreuseghem, R. and M. Takashio (1970). "An atypical strain of *Cryptococcus neoformans* (San Felice) Vuillemin 1894. II. *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* var. nov." Ann Soc Belges Med Trop Parasitol Mycol **50**(6): 695-702.
- Vecchiarelli, A., M. Dottorini, et al. (1994). "Role of human alveolar macrophages as antigen-presenting cells in *Cryptococcus neoformans* infection." Am J Respir Cell Mol Biol **11**(2): 130-137.
- Vecchiarelli, A., C. Monari, et al. (2000). "Dysregulation in IL-12 secretion by neutrophils from HIV-infected patients." Clin Exp Immunol **121**(2): 311-319.
- Vecchiarelli, A., D. Pietrella, et al. (2003). "The polysaccharide capsule of *Cryptococcus neoformans* interferes with human dendritic cell maturation and activation." J Leukoc Biol **74**(3): 370-378.
- Velagapudi, R., Y. P. Hsueh, et al. (2009). "Spores as infectious propagules of *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **77**(10): 4345-4355.
- Villena, S. N., R. O. Pinheiro, et al. (2008). "Capsular polysaccharides galactoxylomannan and glucuronoxylomannan from *Cryptococcus neoformans* induce macrophage apoptosis mediated by Fas ligand." Cell Microbiol **10**(6): 1274-1285.
- Voelz, K., D. A. Lammas, et al. (2009). "Cytokine signaling regulates the outcome of intracellular macrophage parasitism by *Cryptococcus neoformans*." Infect Immun **77**(8): 3450-3457.
- Walenkamp, A. M., A. F. Verheul, et al. (1999). "Pulmonary surfactant protein A binds to *Cryptococcus neoformans* without promoting phagocytosis." Eur J Clin Invest **29**(1): 83-92.
- Walton, F. J., A. Idnurm, et al. (2005). "Novel gene functions required for melanization of the human pathogen *Cryptococcus neoformans*." Mol Microbiol **57**(5): 1381-1396.
- Waters, L. and M. Nelson (2005). "Cryptococcal disease and HIV infection." Expert Opin Pharmacother **6**(15): 2633-2644.
- Williams, A. E., I. R. Humphreys, et al. (2005). "TGF-beta prevents eosinophilic lung disease but impairs pathogen clearance." Microbes Infect **7**(3): 365-374.
- Wiseman, J. C., L. L. Ma, et al. (2007). "Perforin-dependent cryptococcal microbicidal activity in NK cells requires PI3K-dependent ERK1/2 signaling." J Immunol **178**(10): 6456-6464.

- Wozniak, K. L. and S. M. Levitz (2008). "Cryptococcus neoformans enters the endolysosomal pathway of dendritic cells and is killed by lysosomal components." *Infect Immun* **76**(10): 4764-4771.
- Wozniak, K. L., J. M. Vyas, et al. (2006). "In vivo role of dendritic cells in a murine model of pulmonary cryptococcosis." *Infect Immun* **74**(7): 3817-3824.
- Wright, L., W. Bubb, et al. (2002). "Metabolites released by *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* and var. *gattii* differentially affect human neutrophil function." *Microbes Infect* **4**(14): 1427-1438.
- Wright, L. C., J. Payne, et al. (2004). "Cryptococcal phospholipases: a novel lysophospholipase discovered in the pathogenic fungus *Cryptococcus gattii*." *Biochem J* **384**(Pt 2): 377-384.
- Wright, L. C., R. M. Santangelo, et al. (2007). "Cryptococcal lipid metabolism: phospholipase B1 is implicated in transcellular metabolism of macrophage-derived lipids." *Eukaryot Cell* **6**(1): 37-47.
- Xing, J., F. Wu, et al. (2010). "Granulysin production and anticryptococcal activity is dependent upon a far upstream enhancer that binds STAT5 in human peripheral blood CD4+ T cells." *J Immunol* **185**(9): 5074-5081.
- Yauch, L. E., J. S. Lam, et al. (2006). "Direct inhibition of T-cell responses by the *Cryptococcus capsular* polysaccharide glucuronoxylomannan." *PLoS Pathog* **2**(11): e120.
- Yauch, L. E., M. K. Mansour, et al. (2004). "Involvement of CD14, toll-like receptors 2 and 4, and MyD88 in the host response to the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* in vivo." *Infect Immun* **72**(9): 5373-5382.
- Yoneda, A. and T. L. Doering (2008). "Regulation of *Cryptococcus neoformans* capsule size is mediated at the polymer level." *Eukaryot Cell* **7**(3): 546-549.
- Zaragoza, O., M. Alvarez, et al. (2007). "The relative susceptibility of mouse strains to pulmonary *Cryptococcus neoformans* infection is associated with pleiotropic differences in the immune response." *Infect Immun* **75**(6): 2729-2739.
- Zaragoza, O. and A. Casadevall (2006). "Monoclonal antibodies can affect complement deposition on the capsule of the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* by both classical pathway activation and steric hindrance." *Cell Microbiol* **8**(12): 1862-1876.
- Zaragoza, O., C. J. Chrisman, et al. (2008). "Capsule enlargement in *Cryptococcus neoformans* confers resistance to oxidative stress suggesting a mechanism for intracellular survival." *Cell Microbiol* **10**(10): 2043-2057.
- Zaragoza, O., B. C. Fries, et al. (2003). "Induction of capsule growth in *Cryptococcus neoformans* by mammalian serum and CO(2)." *Infect Immun* **71**(11): 6155-6164.
- Zaragoza, O., R. Garcia-Rodas, et al. (2010). "Fungal cell gigantism during mammalian infection." *PLoS Pathog* **6**(6): e1000945.
- Zaragoza, O., C. P. Taborda, et al. (2003). "The efficacy of complement-mediated phagocytosis of *Cryptococcus neoformans* is dependent on the location of C3 in the polysaccharide capsule and involves both direct and indirect C3-mediated interactions." *Eur J Immunol* **33**(7): 1957-1967.



- Zhang, T., K. Kawakami, et al. (1997). "Interleukin-12 (IL-12) and IL-18 synergistically induce the fungicidal activity of murine peritoneal exudate cells against *Cryptococcus neoformans* through production of gamma interferon by natural killer cells." Infect Immun **65**(9): 3594-3599.
- Zhang, Y., F. Wang, et al. (2010). "TLR9 signaling is required for generation of the adaptive immune protection in *Cryptococcus neoformans*-infected lungs." Am J Pathol **177**(2): 754-765.
- Zhang, Y., F. Wang, et al. (2009). "Robust Th1 and Th17 immunity supports pulmonary clearance but cannot prevent systemic dissemination of highly virulent *Cryptococcus neoformans* H99." Am J Pathol **175**(6): 2489-2500.
- Zheng, C. F., G. J. Jones, et al. (2008). "Late expression of granulysin by microbicidal CD4+ T cells requires PI3K- and STAT5-dependent expression of IL-2Rbeta that is defective in HIV-infected patients." J Immunol **180**(11): 7221-7229.
- Zheng, C. F., L. L. Ma, et al. (2007). "Cytotoxic CD4+ T cells use granulysin to kill *Cryptococcus neoformans*, and activation of this pathway is defective in HIV patients." Blood **109**(5): 2049-2057.
- Zhou, Q., R. A. Gault, et al. (2006). "Immunomodulation with CD40 stimulation and interleukin-2 protects mice from disseminated cryptococcosis." Infect Immun **74**(4): 2161-2168.
- Zhou, Q., R. A. Gault, et al. (2007). "Protection from direct cerebral cryptococcus infection by interferon-gamma-dependent activation of microglial cells." J Immunol **178**(9): 5753-5761.
- Zhou, Q. and W. J. Murphy (2006). "Immune response and immunotherapy to *Cryptococcus* infections." Immunol Res **35**(3): 191-208.
- Zhu, X. and P. R. Williamson (2004). "Role of laccase in the biology and virulence of *Cryptococcus neoformans*." FEMS Yeast Res **5**(1): 1-10.

## ANNEXE 1 – MILIEUX UTILISÉS

### Milieu YPD (yeast peptone dextrose)

Extrait de levure	10 g
Peptone	20 g
Dextrose	20 g
Agar	20 g
H <sub>2</sub> O	1 L
Chloramphénicol	50 mg/mL

± 20 mL / Pétri

### Milieu YPD liquide

Extrait de levure	2,5 g
Peptone	5 g
Dextrose	5 g
H <sub>2</sub> O	250 mL

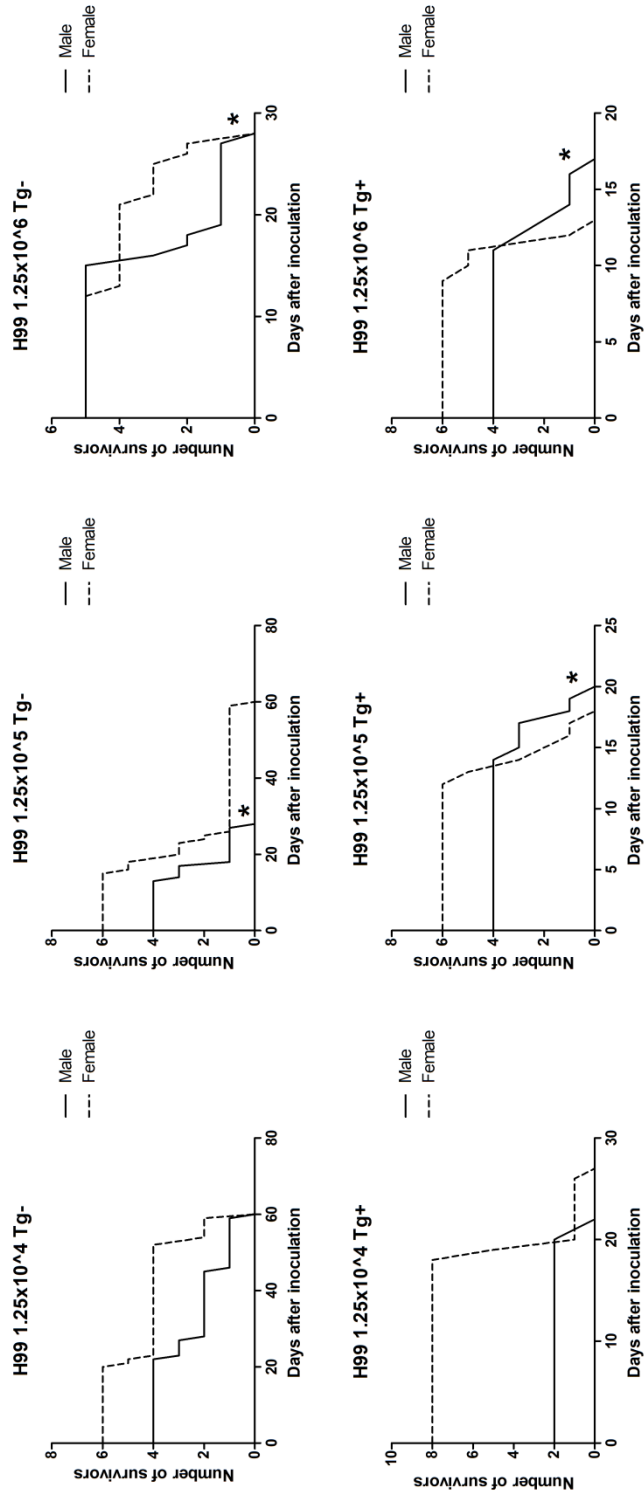
### Eau saline 0,9%

Eau distillée	1000 mL
NaCl	9 g

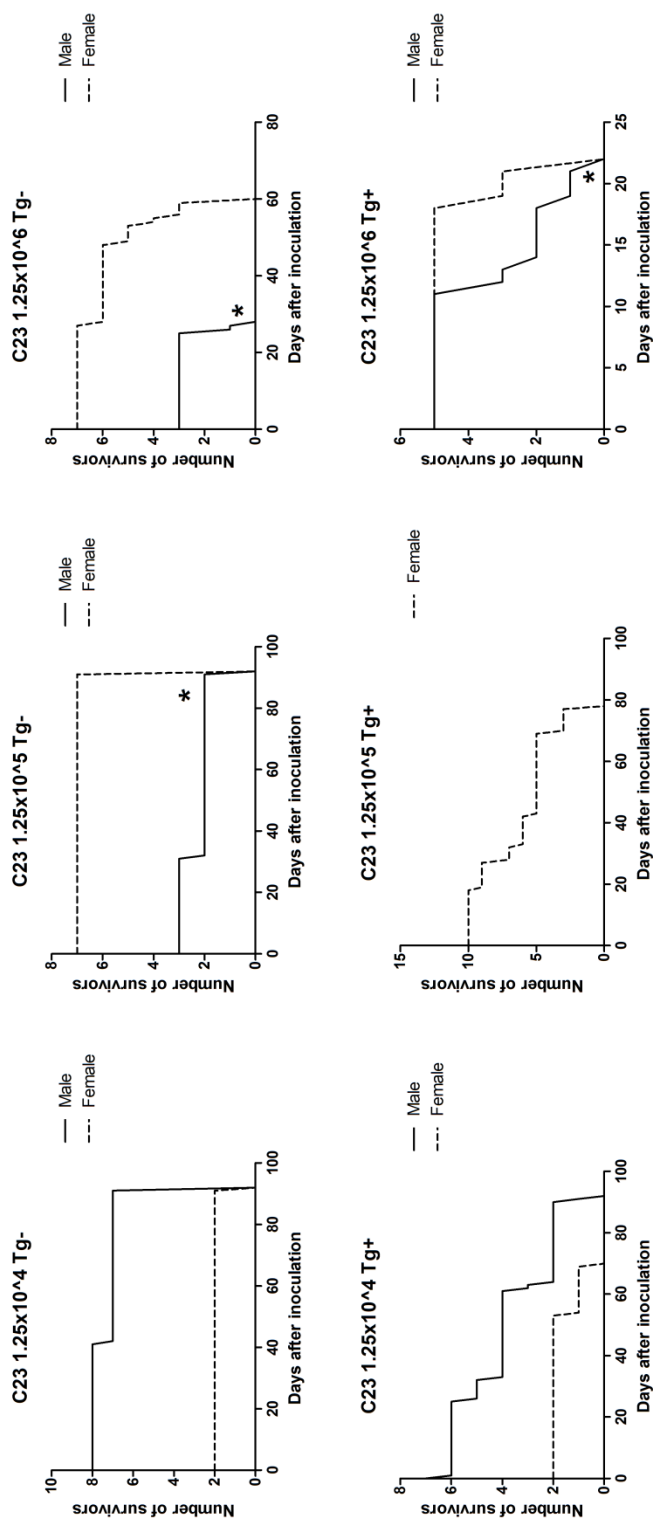
### Milieu RPMI avec collagénase (*Digestion buffer*)

RPMI 1640 sans rouge de phénol	
Pénicilline/Streptomycine	100 U/mL
FBS	5%
Collagénase	1%

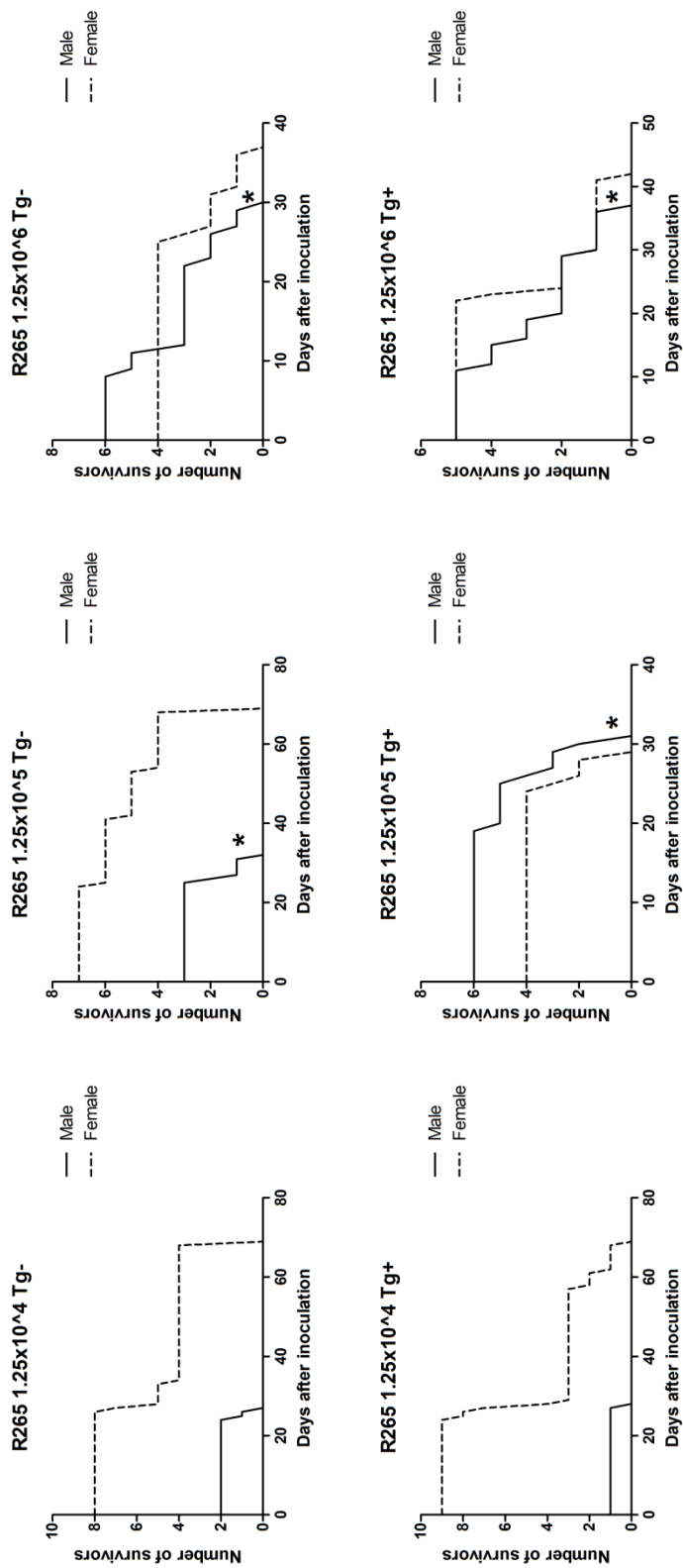
## ANNEXE 2 – FIGURES SUPPLÉMENTAIRES



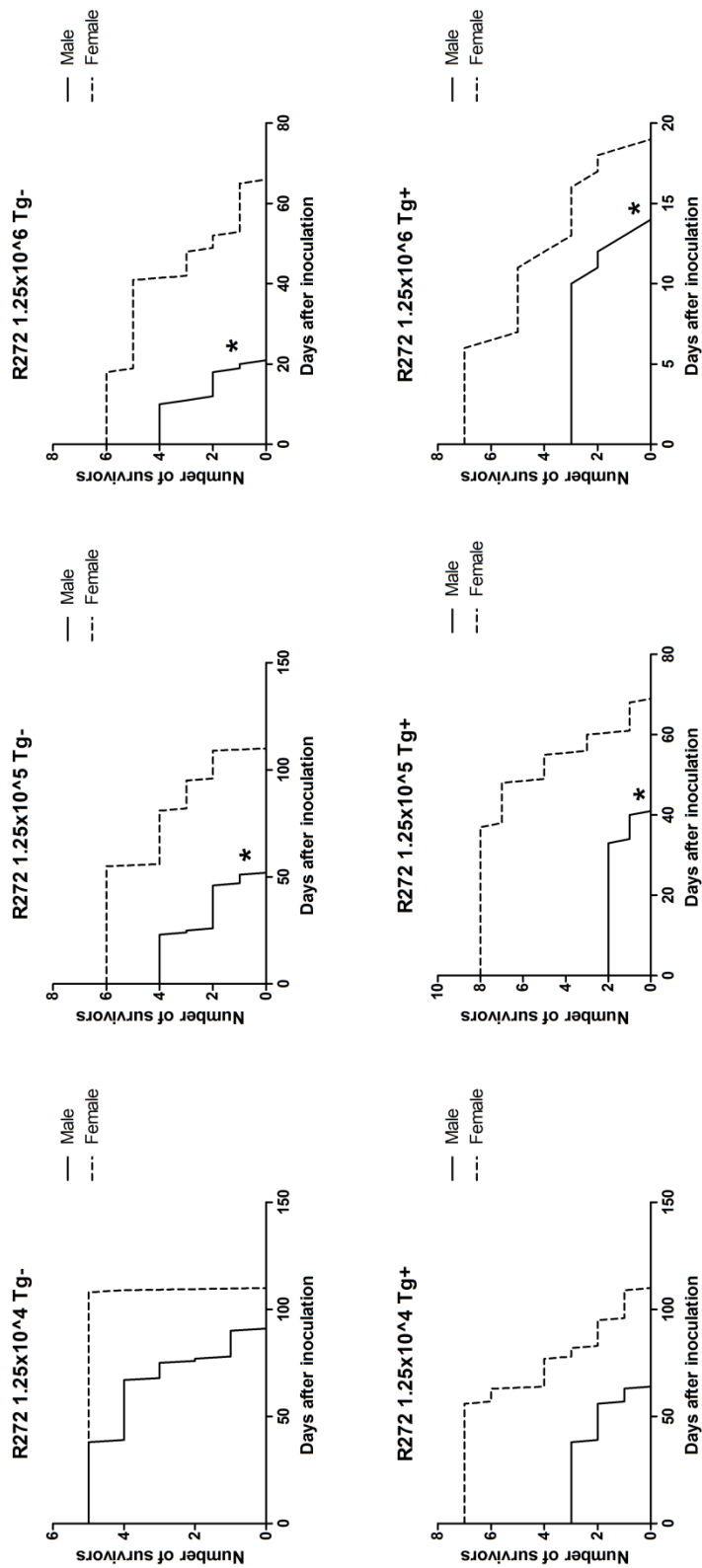
**Figure S1. Courbe de mortalité chez les souris transgéniques CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-transgéniques infectées au *C. neoformans* H99.** Pour chaque souche, 10 souris Tg et non-Tg ont été infectées par voie intra-nasale avec un inoculum de  $1.25 \times 10^4$ ,  $1.25 \times 10^5$  et  $1.25 \times 10^6$ . Les souris sont euthanasiées à l'atteinte des points limites ou la fin de l'expérience (H99: 60 jours). \* indique une différence significative de mortalité entre mâles et femelles ( $p < 0.05$ ). Statistique: Analyse de variance univariée.



**Figure S2. Courbe de mortalité chez les souris transgéniques CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-transgéniques infectées au *C. neoformans* C23.** Pour chaque souche, 10 souris Tg et non-Tg ont été infectées par voie intra-nasale avec un inoculum de  $1.25 \times 10^4$ ,  $1.25 \times 10^5$  et  $1.25 \times 10^6$ . Les souris sont euthanasiées à l'atteinte des points limites ou la fin de l'expérience (C23: 92 jours). \* indique une différence significative de mortalité entre mâles et femelles ( $p < 0.05$ ). Statistique: Analyse de variance univariée.



**Figure S3. Courbe de mortalité chez les souris transgéniques CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-transgéniques infectées au *C. gattii* R265.** Pour chaque souche, 10 souris Tg et non-Tg ont été infectées par voie intra-nasale avec un inoculum de  $1.25 \times 10^4$ ,  $1.25 \times 10^5$  et  $1.25 \times 10^6$ . Les souris sont euthanasiées à l'atteinte des points limites ou la fin de l'expérience (R265: 69 jours). \* indique une différence significative de mortalité entre mâles et femelles ( $p < 0.05$ ). Statistique: Analyse de variance univariée.



**Figure S4. Courbe de mortalité chez les souris transgéniques CD4C/HIV<sup>MutA</sup> et non-transgéniques infectées au *C. gattii* R272.** Pour chaque souche, 10 souris Tg et non-Tg ont été infectées par voie intra-nasale avec un inoculum de  $1.25 \times 10^4$ ,  $1.25 \times 10^5$  et  $1.25 \times 10^6$ . Les souris sont euthanasiées à l'atteinte des points limites ou la fin de l'expérience (R272: 110 jours). \* indique une différence significative de mortalité entre mâles et femelles ( $p < 0.05$ ). Statistique: Analyse de variance univariée.