

Université de Montréal

**Analyse de la réponse macrophagique au *Candida albicans* chez la souris
transgénique exprimant le génome du VIH-1**

par
Mathieu Goupil

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

2009

©Mathieu Goupil, 2009

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Analyse de la réponse macrophagique au *Candida albicans* chez la souris
transgénique exprimant le génome du VIH-1**

Présenté par :

Mathieu Goupil

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jacques Thibodeau
Président-rapporteur

Dr. Louis de Repentigny
Directeur de recherche

Dr. Serge Montplaisir
Membre du jury

RÉSUMÉ

La candidose oro-pharyngée (COP) est l'infection opportuniste la plus répandue chez les patients infectés au VIH-1. Un modèle de COP chez la souris transgénique (Tg) exprimant une partie du génome du VIH-1 (CD4C/HIV^{MutA}) est maintenant disponible. Grâce à ce modèle, il est possible d'étudier les perturbations quantitatives et fonctionnelles des macrophages exprimant les gènes *nef*, *rev* et *env* du VIH-1 dans le contexte d'une COP. Cette étude démontre que la présence du transgène n'influence pas le pourcentage des macrophages dans la muqueuse buccale et le petit intestin, malgré le fait que la charge buccale de *C. albicans* soit significativement plus élevée chez les souris Tg. Cependant, l'expression du transgène cause une diminution de la production de H₂O₂ par les macrophages, ainsi que l'augmentation de la production de la cytokine proinflammatoire IL-6 et de la chimiokine MCP-1.

MOTS CLÉS :

Candidose oropharyngée

Cytokine

Macrophage

Modèle animal

Peroxyde

VIH-1

SUMMARY

Oro-pharyngeal candidiasis (OPC) is the most common opportunistic infection in HIV-1 infected patients. An OPC model using transgenic mice (CD4C/HIV^{MutA}) expressing selected genes of the HIV-1 genome is now available. Using this model, it is now possible to study potential quantitative and functional disturbances in macrophages expressing the *nef*, *rev* and *env* genes of HIV-1 in the context of OPC. This study shows that transgene expression does not affect quantitative percentage values of macrophages in the oral mucosa and the small intestine, although burdens of *C. albicans* loads are increased in Tg mice. Transgene expression does induce diminished H₂O₂ production in macrophages, while increasing production of the proinflammatory cytokine IL-6 and the chemokine MCP-1.

KEY WORDS

Animal model

Cytokine

HIV-1

Macrophage

Oropharyngeal candidiasis

Peroxide

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux	iii
Liste des figures	iv
Liste des sigles et abréviations.....	vi
Remerciements.....	viii
Avant-propos	1
Chapitre 1 : <i>Candida albicans</i> et la candidose	2
1.1 Description de <i>Candida albicans</i>	2
1.2 Épidémiologie et principales manifestations cliniques	4
1.3 Pathogénèse des infections au <i>Candida albicans</i>	5
1.4 Les défenses immunitaires contre <i>Candida albicans</i>	7
1.4.1 La muqueuse buccale	7
1.4.2 Les protéines salivaires	8
1.4.3 Leucocytes polymorphonucléaires (PMNs)	10
1.4.4 Kératinocytes.....	11
1.4.5 Cellules de Langerhans	13
1.4.6 Macrophages	14
1.4.7 Cellules NK (<i>Natural Killer</i>)	17
1.4.8 Lymphocytes T.....	18
1.4.9 Lymphocytes B.....	21
Chapitre 2 : La candidose dans le contexte de l'infection au VIH.....	23
2.1 Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)	24
2.2 Les perturbations du système immunitaire causées par l'infection au VIH..	27
2.3 La candidose oro-pharyngée	29
Chapitre 3 : Les modèles murins et l'étude de la candidose oro-pharyngée	31
Hypothèses	38

Chapitre 4 : Matériel et méthodes	39
4.1 Modèle animal	39
4.2 Infection des souris au <i>Candida albicans</i>	40
4.3 Décomptes des unités formatrices de colonies (CFUs) de la muqueuse buccale.....	41
4.4 Prélèvement et préparation de la muqueuse buccale et du petit intestin	41
4.5 Marquage des macrophages et cytométrie en flux (FACS)	42
4.6 Prélèvement des cellules de l'exsudat péritonéal (PECs)	43
4.7 Quantification de la production de H ₂ O ₂ par les macrophages péritonéaux	44
4.8 Production de cytokines par les macrophages péritonéaux.....	45
Chapitre 5 : Résultats.....	47
Chapitre 6 : Discussion	58
Bibliographie.....	69
Annexe 1	ix

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I - Anticorps utilisés pour l'analyse des macrophages en cytométrie en flux	42
Tableau II – Combinaisons d'anticorps utilisés pour l'analyse des macrophages en cytométrie en flux	43

LISTE DES FIGURES

Figure 1 - Les différentes morphologies et la croissance de <i>Candida albicans</i> ..	3
Figure 2 – Les programmes d’activation classique (M1) et alternative (M2) ainsi que la désactivation des macrophages	16
Figure 3 - Organisation structurale des virions du VIH-1	24
Figure 4 – Le génome du VIH-1.....	25
Figure 5 - La candidose oro-pharyngée pseudomembraneuse.....	29
Figure 6 – La candidose oro-pharyngée érythémateuse	30
Figure 7 - Diverses constructions du transgène du VIH-1 produites au laboratoire du Dr. Paul Jolicoeur	35
Figure 8 – Charge buccale de <i>C. albicans</i> chez la souris transgénique et non-transgénique.....	36
Figure 9 - Réaction de l’Amplex Red.....	45
Figure 10 – La primo-infection chez les souris Tg et non-Tg.....	47
Figure 11 - Infection chronique au <i>C. albicans</i> chez les souris Tg	48
Figure 12 – Les huit groupes requis pour la quantification des macrophages..	49
Figure 13 - Méthode d’analyse des macrophages par FACS sur le logiciel FlowJo.....	50

- Figure 14 – Diminution du pourcentage de macrophages présents dans la muqueuse buccale chez les souris âgées infectées au *C. albicans* 52**
- Figure 15 - Diminution du pourcentage de macrophages présents dans la muqueuse buccale chez les souris âgées infectées au *C. albicans* et chez les souris Tg..... 53**
- Figure 16 – Baisse significative de production de H₂O₂ par les macrophages des souris Tg jeunes et vieilles..... 55**
- Figure 17 - Augmentation de la production macrophagique de TNF- α en présence de *C. albicans* et production d'une quantité supérieure d'IL-6 et de MCP-1 par les macrophages des souris Tg..... 57**

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

AIDS : *acquired immunodeficiency syndrome*

ALS : *agglutinin-like sequences*

APC : fluorochrome allophycocyanine

C4BP : *C4 binding protein*

CD : *cluster of differentiation* exemple : CD4, CD45

CL: cellule de Langerhans

CMH: complexe majeur d'histocompatibilité

COP : candidose oro-pharyngée

DC : cellule dendritique

Egf : *epidermal growth factor*

ERK: *extracellular signal-regulated kinase*

FHL-1: *factor H-like protein-1*

FITC : fluorochrome *fluorescein isothiocyanate*

Foxp3 : *forkhead box P3*

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

GMX : glucuronoxylomannane

HAART : *highly active anti-retroviral therapy*

HIV : *Human immunodeficiency virus*

Hwp1p : *hyphal wall protein-1*

IFN : interféron

IL : interleukine

iNOS : *inducible nitric oxide synthase*

IRF-3 : *interferon regulatory factor 3*

JNK : *c-Jun N-terminal kinase*

KcMR : *keratinocyte mannose receptor*, récepteur du mannose des kératinocytes

LTR : *long terminal repeat*

MAPK : *Mitogen-activated protein kinase*

MIP : *macrophage inflammatory protein*

MR: *mannose receptor*, récepteur du mannose

MTL : *mating-type like*
MyD88 : *Myeloid differentiation primary response gene 88*
NF- κ B : Facteur de transcription nucléaire, *Nuclear Factor-kappaB*
NIAID : *National Institute of Allergy and Infectious Diseases*
NK : *Natural Killer*
NO : oxyde nitrique
Non-Tg : non-transgénique
OPC : *Oro-pharyngeal candidiasis*
PAMP : *pathogen-associated molecular patterns*
PE : fluorochrome phycoérythrine
PECs : cellules d'exsudat péritonéal
PerCP : fluorochrome *peridinin chlorophyll-a protein*
PKC : Protéine kinase C
PMN : polymorphonucléaire neutrophile
PRR : *pattern recognition receptor*
Saps : *secretory aspartyl proteinase*
SCID : *severe combined immunodeficiency*
SIDA : syndrome d'immunodéficience acquise
STAT : *signal transducer and activator of transcription*
TCR : *T cell receptor*
Tg : transgénique
TGF : *transforming growth factor*
TLR : *toll-like receptor*
TNF : *tumor necrosis factor*
VIH : virus de l'immunodéficience humaine

REMERCIEMENTS

Merci au Dr. Louis de Repentigny, pour son accueil au sein de son équipe, pour sa disponibilité, sa compréhension, pour les heures passées à m'aider, ainsi que pour l'intérêt soutenu qu'il manifeste à mon égard.

Merci à Mme Francine Aumont, pour sa patience, son amitié et son aide précieuse tout au long de mes recherches.

Merci à Émilie Bélanger Trudelle, en qui j'ai trouvé une interlocutrice passionnée.

Merci à M. Serge Sénéchal, pour ses précieux conseils et ses analyses judicieuses.

Merci à ma famille et mes amis, qui m'ont soutenu tout au long de mes démarches et qui trouvent fantastique mon désir de poursuivre mes études.

Merci à tous.

AVANT-PROPOS

Le VIH crée une immunodéficience chez l'homme causant l'apparition d'infections opportunistes. Parmi les patients atteints d'infection au VIH, 50 à 90 % subiront une candidose oro-pharyngée (COP) (Rabeneck, Crane et al. 1993). Cette infection fongique est causée par le *Candida albicans*, une levure commensale retrouvée dans le tractus gastro-intestinal chez 80 % des humains sains (Gorbach, Nahas et al. 1967). L'utilisation de la thérapie antirétrovirale hautement active (*Highly Active Antiretroviral Therapy*, HAART) diminue fortement l'incidence de COP chez les sidéens en rétablissant l'immunité de l'hôte contre le *C. albicans* (Yang, Lo et al. 2006).

CHAPITRE 1 : *CANDIDA ALBICANS* ET LA CANDIDOSE

Description de *Candida albicans*

Candida albicans est une levure diploïde polymorphe dont le génome comporte 8 paires de chromosomes pour un total de 6354 ORFs (*Open Reading Frames*) (Nantel 2006). Parmi ces gènes, 228 sont retrouvés uniquement chez les génomes fongiques et sont absents des génomes des mammifères. Ainsi, les produits de ces gènes constitueraient des cibles potentielles pour le développement de nouveaux antifongiques (Nantel 2006). Par ailleurs, la plupart de ces 228 gènes codent pour des transporteurs membranaires et des enzymes. Parmi les autres gènes d'intérêt, notons particulièrement les gènes associés aux facteurs de virulence, comme les lipases, les protéinases, les agglutinines de surface ainsi que les transporteurs de type ABC, qui sont des pompes d'efflux responsables de la résistance aux antifongiques azolés (Nantel 2006). Le polymorphisme de *C. albicans* comporte quatre formes principales. Celles-ci sont représentées *in vivo* par les formes levure, pseudohyphe et hyphe (Fig. 1). La quatrième forme, la chlamydo-spore, est retrouvée uniquement *in vitro* dans des conditions suboptimales de croissance résultant d'apports nutritionnels pauvres (Fig. 1). Chacune des formes de *C. albicans* possède une morphologie différente. La forme levure est constituée de cellules rondes, les blastoconidies, qui se reproduisent par bourgeonnement. Les hyphes sont de longs tubes à parois parallèles sans constriction, dont les cellules sont séparées par des cloisons (*septa*). Cette morphologie est produite *in vitro* sous forme de tubes germinatifs lorsque la forme levure est mise en présence de sérum, à des températures élevées et est inhibée par le farnesol, une molécule de *quorum sensing* (Whiteway and Oberholzer 2004). Les pseudohyphes sont composés de blastoconidies allongées séparées par des constriction formant des chaînes et sont principalement formées lors d'une carence en acides aminés signalée par la voie de Ras/AMPC. Les chlamydo-spores sont des cellules rondes aux parois très épaisses habituellement situées en position terminale sur les hyphes. (Whiteway and Oberholzer 2004; Whiteway and Bachewich 2007) *C. albicans* possède aussi la capacité de produire un biofilm lorsque le champignon est en présence d'une surface muco-sale ou d'une prothèse tel un dentier ou un cathéter

(Whiteway and Oberholzer 2004). Un biofilm contient un mélange de blastoconidies, d'hyphes ainsi que de pseudohyphes et sa formation est déclenchée par le facteur de transcription Efg1 (Whiteway and Oberholzer 2004).

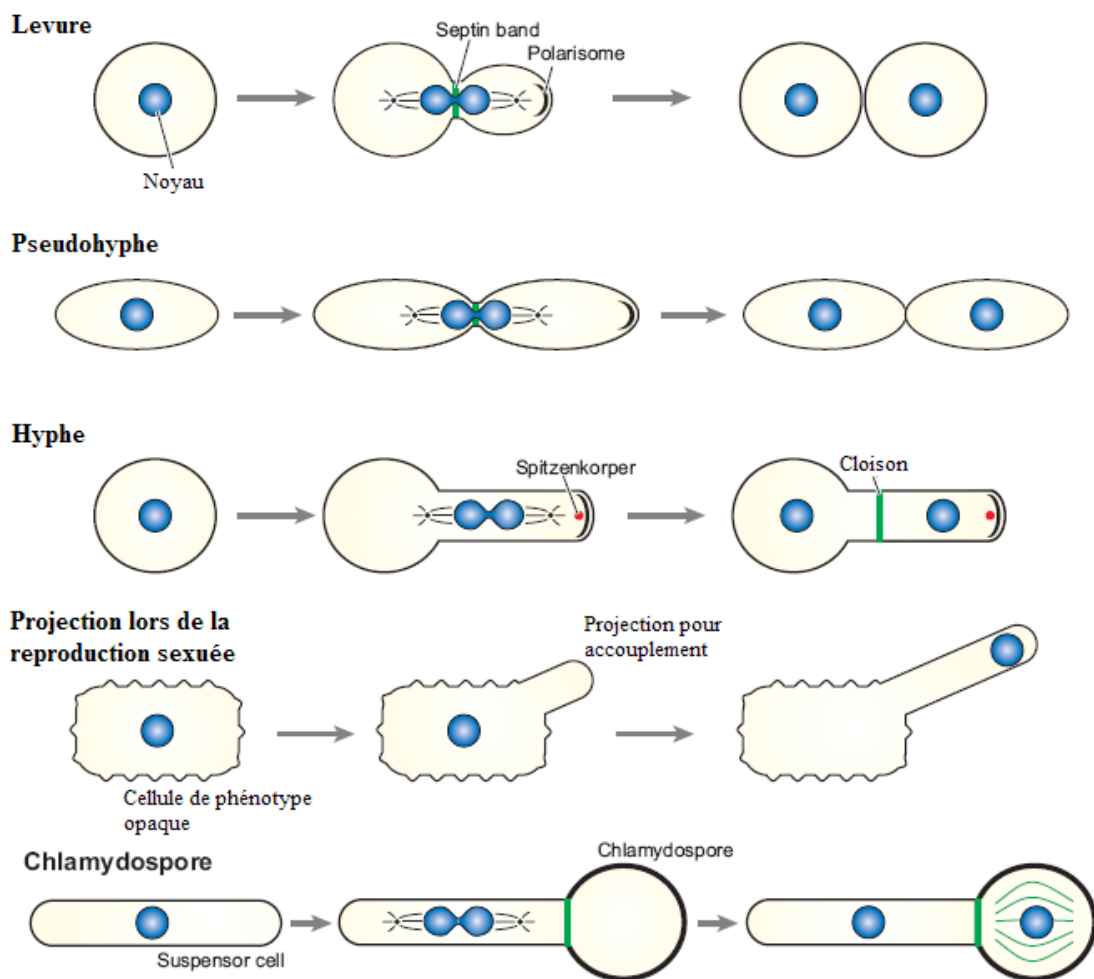


Figure 1. Les différentes morphologies et la croissance de *Candida albicans* (Whiteway and Bachewich 2007)

C. albicans, longtemps considéré comme asexué, est en fait un organisme parasexué (Noble and Johnson 2007). Des études récentes ont permis la découverte d'un locus nommé MTL (*Mating Type-Like*) sur le chromosome 5 du génome de *C. albicans* qui possède une forte analogie avec le locus MAT de *Saccharomyces cerevisiae* et qui est impliqué dans la reproduction sexuée de cette levure (Nantel 2006; Noble and Johnson 2007). La reproduction sexuée de *C. albicans* est directement dépendante du locus MTL, qui contrôle le phénotype de colonie opaque ou blanche. *C. albicans* doit

en effet être sous la forme opaque afin de détecter, par la voie de signalisation Cek1 MAPK, les phéromones nécessaires à reproduction sexuée (Whiteway and Oberholzer 2004; Whiteway and Bachewich 2007). Si le *C. albicans* est hétérozygote pour le locus MTL, celui-ci ne peut pas passer du phénotype de colonies blanches (colonies normales) à colonies opaques car chacun des allèles MTL α et MTL α produisent une des sous unités du répresseur $\alpha 1/\alpha 2$ contrôlant l'expression du facteur de transcription WOR1p, qui est nécessaire pour l'induction du phénotype opaque. Ainsi, seules les souches homozygotes pour le locus MTL pourront réussir une reproduction sexuée (Whiteway and Bachewich 2007). Des études réalisées *in vitro* suggèrent que les biofilms sont favorables à la reproduction sexuée, car ceux-ci maintiennent le gradient de concentration des phéromones α ou α permettant aux cellules homozygotes de diriger, par chimiotropisme, un appendice d'accouplement vers un partenaire complémentaire (Daniels, Srikantha et al. 2006).

Épidémiologie et principales manifestations cliniques

Les infections à *Candida ssp.* sont la 4^e cause d'infection nosocomiale hématogène aux Etats-Unis et constituent 72 % des infections fongiques répertoriés (Jarvis 1995; Calderone 2002). Chez 76 % de ces cas, l'espèce *C. albicans* est en cause (Jarvis 1995). Les autres espèces de *Candida* les plus souvent retrouvées dans ces infections sont, en ordre décroissant, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* et *Candida dubliniensis* (Calderone 2002).

Il existe plusieurs types de candidose des muqueuses. Au niveau buccal, cinq types de candidose sont possibles, soit la candidose pseudomembraneuse, qui est la plus fréquente, la candidose érythémateuse, la candidose hyperplastique et la perlèche. La baisse de la résistance tissulaire causée par une infection, les irritants chroniques, comme la cigarette, les appareils d'orthodontie, la prise d'antibiotiques à large spectre, l'infection au VIH, le cancer et la chimiothérapie sont tous des facteurs prédisposants à ces types de candidose (Glick and Siegel 1999; Calderone 2002; Netea, Brown et al. 2008). De plus, 75 % des femmes subiront au moins une fois dans leur vie un épisode de candidose vulvovaginale et 10 à 20 % sont porteuses de

C. albicans, qui en est la cause la plus fréquente (Calderone 2002). Les candidoses vulvovaginales sont principalement influencées par le pH de la muqueuse vaginale, la quantité de glycogène disponible, le niveau hormonal et la grossesse (Galask 1988; Calderone 2002).

La majorité des candidoses disséminées proviennent du tractus gastro-intestinal (Calderone 2002). L'incidence des candidoses systémiques oscille entre 1,1 et 24 cas par 100 000 personnes, et le taux de mortalité est de plus de 30 % (Netea, Brown et al. 2008). Si les candidoses systémiques surviennent très rarement chez des hôtes sains, la majorité des personnes à risque sont atteintes de neutropénie, ont récemment subi une chirurgie abdominale, souffrent du cancer, du diabète ou d'une infection au VIH (Calderone 2002).

Pathogénèse des infections au *Candida albicans*

Pour qu'un pathogène, tel *C. albicans*, ait la capacité de causer une infection, celui-ci doit être en mesure de circonvenir ou d'échapper au système immunitaire. Les mécanismes qu'utilisent les microorganismes pathogènes pour en arriver à cette fin se nomment les facteurs de virulence.

L'adhérence, la production de protéinases et de phospholipases, la formation d'hyphes et le changement de phénotypes (morphogénèse) sont des facteurs de virulence chez *C. albicans* (Calderone and Fonzi 2001; Yang 2003).

Les adhésines permettent l'attachement et la colonisation des surfaces épithéliales par *C. albicans* en créant des liaisons covalentes entre les cellules épithéliales et le β -glucane de la paroi cellulaire. La famille des ALS (*agglutinin-like sequence proteins*) et la protéine Hwp1p (*hyphal wall protein-1*) sont particulièrement efficaces pour l'adhésion et la formation de biofilms, qui permettent à *C. albicans* de mieux résister aux antifongiques (Chai, Netea et al. 2008). Les protéines de la famille ALS sont ancrées sur le β -glucane et sont réparties de façon homogène à la surface de la paroi cellulaire. L'homologie de Als1p avec l' α -agglutinine, une glycoprotéine d'adhésion

de *Saccharomyces cerevisiae*, suggère une fonction d'adhésine (Calderone and Fonzi 2001). Toutefois, les fonctions des ALS sont différentes de l' α -agglutinine. Par exemple, Als1p se lie aux surfaces de l'hôte et n'a pas pour fonction l'adhésion de deux cellules de *C. albicans* lors de la reproduction sexuée (Hoyer, Green et al. 2008). La mannoprotéine Hwp1p est aussi située au niveau de la paroi et la séquence de son domaine amino-terminal est analogue aux séquences des substrats de la transglutaminase (TGase) (Calderone and Fonzi 2001). La TGase peut donc lier de façon covalente Hwp1p et les cellules de l'épithélium buccal (Calderone and Fonzi 2001).

Il est aussi nécessaire pour *C. albicans* de camoufler ses PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) pro-inflammatoires, car ceux-ci ont été identifiés comme responsables du déclenchement de la réponse immunitaire. Le système immunitaire possède la capacité de détecter les PAMPs de *Candida* par les TLR2 (*Toll-Like Receptor*) et TLR4 (Chai, Netea et al. 2008). TLR2 peut reconnaître des molécules composant la paroi cellulaire, comme le zymosan, le phospholipomannane et le glucuronoxylomannane (GXM) tandis que TLR4 reconnaît le GXM et les mannanes ayant des liaisons O (Chai, Netea et al. 2008). Pour parvenir à un camouflage efficace, *C. albicans* peut aussi changer du phénotype levure, sous lequel les cicatrices de bourgeonnement exposent le β -glucane qui peut être reconnu par la Dectine-1, au phénotype hyphe, chez lequel le β -glucane demeure caché sous les mannanes de surface. De plus, la forme hyphe active le TLR2 mais pas le TLR4, qui est responsable de la production d'IFN- γ , ayant donc pour effet d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse non protectrice de type Th2 plutôt que vers une réponse protectrice de type Th1 (Chai, Netea et al. 2008). *C. albicans* possède aussi la capacité d'éviter l'activation du complément en liant sur sa surface les protéines FHL-1 (*Factor H-like protein 1*) et C4BP (*C4 Binding Protein*), qui sont deux régulateurs négatifs du complément (Chai, Netea et al. 2008). Une autre stratégie d'évasion de *Candida* est l'endocytose, avec l'aide de la protéine de surface N-cadhérine, qui permet à *Candida* d'entrer, entre autres, dans les cellules épithéliales et les macrophages (Chai, Netea et al. 2008). Cette stratégie permet à la fois d'éviter l'activation du complément et la détection des PAMPs. Une fois à l'intérieur de ces

cellules, *Candida* possède des mécanismes rapides d'induction de gènes du stress oxydatif, permettant une résistance à l'effet antifongique du monoxyde d'azote (NO).

Un facteur majeur de virulence de *C. albicans* est la production de Saps (*secretory aspartyl proteinases*). Les Saps font toutes parties de la même famille d'enzymes sécrétées, soit les protéinases aspartyles, dont les fonctions principales sont la décomposition de molécules complexes en nutriments simples à assimiler. En cours d'infection, les Saps sont aussi impliquées dans l'hydrolyse des membranes cellulaires de l'hôte afin de faciliter l'adhérence, l'invasion et l'obtention de nutriments (Chai, Netea et al. 2008). Il existe 10 Saps connues chez *C. albicans*, qui sont actives à des pH variant de 2 à 7. Les Saps 1 à 8 sont sécrétées dans le milieu, tandis que les Saps 9 et 10 restent ancrées dans la paroi cellulaire. Chacun des gènes codant pour les différentes Saps possède un promoteur différent, permettant un contrôle individuel des niveaux d'expression de Saps, ainsi que la coordination de l'expression de plusieurs facteurs de virulence comme la formation d'hyphes. Par ailleurs, des études de réactions en chaîne par la polymérase (PCR) réalisées chez des patients atteints de candidose et des porteurs sains révèlent que tous les gènes *SAPs* sont exprimés tant dans la phase commensale que dans la phase infectieuse, mais que *SAP2* et *SAP5* sont exprimés plus fortement lors d'une infection et que *SAP4* à *SAP6* sont surexprimés durant la formation d'hyphes et au cours des infections systémiques (Chai, Netea et al. 2008).

Les défenses immunitaires contre *Candida albicans*

La muqueuse buccale

La première défense contre *C. albicans* est la muqueuse buccale, qui agit comme barrière physique bloquant l'accès de *Candida* aux tissus sous-jacents. La muqueuse buccale est formée de l'épithélium pavimenteux stratifié qui peut être kératinisé ou non, et de la lamina propria, où se retrouvent les infiltrations de cellules immunitaires lors d'infections (Nanci and Ten Cate 2003). De plus, la desquamation de la muqueuse buccale permet d'éliminer une partie des pathogènes qui y adhèrent.

Les protéines salivaires

Plusieurs molécules aux propriétés antifongiques et actives contre *C. albicans* sont sécrétées par les cellules de la muqueuse buccale.

La calprotectine est une protéine hétérodimérique de 36,5 kDa qui lie le calcium et le zinc (Kleinegger, Stoeckel et al. 2001). En liant le zinc, la calprotectine prive *C. albicans* d'un nutriment essentiel. *In vitro* cela cause à faible concentration une inhibition de la croissance, et la mort du microorganisme à haute concentration (Kleinegger, Stoeckel et al. 2001). Dans la muqueuse buccale, la calprotectine est sécrétée par les granulocytes, les monocytes, les macrophages et les cellules épithéliales (Kleinegger, Stoeckel et al. 2001).

Les défensines sont de petits peptides cationiques de 3 à 5 kDa que l'on sépare en α -défensines et β -défensines, en fonction de la distribution des cystéines et des ponts disulfure (Niyonsaba and Ogawa 2005). On retrouve les défensines principalement dans les granules azmophiles des granulocytes, ainsi que dans les cellules de Paneth de l'intestin, mais elles sont aussi produites par une variété d'épithéliums, incluant la peau (Niyonsaba and Ogawa 2005). Elles ont un effet antifongique contre *C. albicans* et exercent aussi une activité chimiotactique à l'égard des monocytes, neutrophiles et cellules T (Niyonsaba and Ogawa 2005).

Les histatines sont des peptides cationiques riches en histidine possédant des propriétés antifongiques, produits par les glandes salivaires parotide et sous-mandibulaire. Les niveaux d'histatine augmentent chez les patients atteints de COP chronique, par rapport aux témoins sains (Kavanagh and Dowd 2004). Il existe plusieurs histatines, mais la plus active contre *C. albicans* est l'histatine5, qui est obtenue par clivage protéolytique de l'histatine3. Les histatines pénètrent dans la cellule cible en se liant à un récepteur sur la paroi cellulaire afin de pouvoir atteindre leur cible, la mitochondrie, où elles induisent la perte d'ATP de façon non-lytique, ce qui entraîne la mort cellulaire (Kavanagh and Dowd 2004). Les histatines possèdent aussi la capacité d'augmenter la production des radicaux d'oxygène et de perturber le cycle cellulaire. L'histatine5 bloque la forme levure de *C. albicans* en phase G1, ce

qui retarde la transition vers la forme hyphe, et réduit donc la pathogénicité (Kavanagh and Dowd 2004).

Le lysozyme est une hydrolase de 14 kDa produite par les macrophages, les monocytes, les PMNs, et les kératinocytes de la muqueuse buccale, et qui possède une activité fongicide à haute concentration. Le lysozyme réduit la quantité et la fonction des Saps lorsque sa concentration est sous létale. (Niyonsaba and Ogawa 2005)

La lactoferrine est une glycoprotéine de 77 kDa sécrétée par les PMNs et les cellules épithéliales de la muqueuse pouvant lier le fer, ce qui en diminue la disponibilité dans l'environnement (Lupetti, Paulusma-Annema et al. 2000). La lactoferrine possède une activité fongistatique inhibant la croissance de *C. albicans* (Soukka, Tenovuo et al. 1992; Nikawa, Samaranayake et al. 1993). Cependant, cette fonction anti-*Candida* ne provient pas uniquement de sa capacité à lier le fer. En effet, la lactoferrine possède aussi la capacité d'induire des altérations de la perméabilité de la membrane cytoplasmique de *C. albicans* (Kuipers, de Vries et al. 1999). De plus, il existe une synergie entre la lactoferrine et le fluconazole, l'amphotéricine B et la 5-fluorocytosine augmentant l'efficacité de ces antifongiques lors de la candidose oro-pharyngée chez les patients immunosupprimés (Kuipers, de Vries et al. 1999). Par ailleurs, des lavages buccaux à l'aide d'une solution contenant de la lactoferrine permet de réduire l'incidence de candidose oro-pharyngée chez des souris immunosupprimées (Takakura, Wakabayashi et al. 2004).

L'antileucoprotéase, aussi nommée inhibiteur de protéase leucocytaire, est une antiprotéase non-glycosylée de 11,7 kDa possédant un effet fongistatique proportionnel à sa concentration (Chattopadhyay, Gray et al. 2004; Dumas, Kolokotronis et al. 2005). L'antileucoprotéase est sécrétée par les cellules épithéliales des muqueuses orales, nasales, pulmonaires et vaginales (Chattopadhyay, Gray et al. 2004). L'effet fongicide de l'antileucoprotéase est localisé au niveau du domaine amino-terminal de la protéine et permet d'inhiber de manière dose-dépendante la croissance de *C. albicans in vitro* (Tomee, Hiemstra et al. 1997; Chattopadhyay,

Gray et al. 2004). De plus, une production élevée d'antileucoprotéase est une réponse défensive contre *Candida* chez les patients infectés au VIH-1 et pourrait être utilisée comme marqueur biologique de la candidose oro-pharyngée (Chattopadhyay, Gray et al. 2004).

Enfin, la salive humaine contient deux types de peroxydases, provenant de deux sources distinctes. La peroxydase salivaire provient des glandes salivaires parotides et sous-mandibulaires, tandis que la myéloperoxydase provient des PMNs. Ces deux peroxydases catalysent l'oxydation du thiocyanate (SCN^-) en présence de peroxyde (H_2O_2), générant ainsi un ensemble de produits antimicrobiens (Ihalin, Loimaranta et al. 2006). Des études réalisées *in vitro* indiquent que les concentrations de SCN^- et de H_2O_2 présentes dans la salive sont importantes pour l'activité antifongique et que *C. albicans* est sensible à l'acide d'hypothiocyanate (HOSCN) et aux ions d'hypothiocyanate (OSCN^-) produits par les peroxydases. Toutefois, la concentration physiologique de phosphate dans la salive inhibe l'effet antifongique des peroxydases (Lenander-Lumikari 1992). Les peroxydases joueraient donc plutôt un rôle protecteur des cellules de l'hôte en retirant les molécules cytotoxiques tels les radicaux libres ainsi que certaines molécules carcinogènes (Ihalin, Loimaranta et al. 2006).

Leucocytes polymorphonucléaires (PMNs)

Les PMNs, des granulocytes dont le noyau est multilobé, sont les leucocytes les plus nombreux du système immunitaire inné (Kennedy and Deleo 2008). La grande majorité, soit de 40 à 60 % de ces cellules, se retrouvent dans la circulation sanguine (Woods, Davis et al. 1999; Paul 2003). Ce sont par ailleurs les premiers leucocytes à être recrutés au site d'une infection ou d'une inflammation (Kennedy and Deleo 2008). Le renouvellement des PMNs est assuré constitutivement par l'apoptose, qui est augmentée suite à la phagocytose de microorganismes pathogènes (Kobayashi, Voyich et al. 2005). Les PMNs peuvent adhérer à l'endothélium, y pénétrer par diapédèse pour ensuite migrer vers le site d'infection par chimiotactisme (Woods, Davis et al. 1999). Les molécules IL-6, TNF- α et G-CSF (*Granulocyte Colony Stimulating Factor*) sont essentielles pour le recrutement aux sites infectieux

(Kullberg, Netea et al. 1999). En effet, des études sur des souris IL-6 $-/-$ ou TNF $-/-$ démontrent que l'absence de IL-6 ou de TNF- α cause une diminution du recrutement des PMNs aux sites d'infections, sans que la capacité des PMNs à tuer *Candida* en soit affectée (Kullberg, Netea et al. 1999). Suite à la phagocytose, les PMNs mobilisent un ensemble de mécanismes fongicides, incluant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS, *Reactive Oxygen Species*) et le relargage des granules dans les vacuoles. Ces granules contiennent des molécules cytotoxiques tels que la lactoferrine et des enzymes de dégradation (Woods, Davis et al. 1999; Paul 2003). Les granules des PMNs peuvent dégrader directement les parois des hyphes de *C. albicans*, mais l'effet fongicide est amplifié davantage par l'oxydation des glycoprotéines de surface et la fragmentation de l'ADN causées par la poussée oxydative (Christin, Wysong et al. 1997). De plus, les PMNs de souris transgéniques exprimant le génome du VIH-1 et de témoins non-transgéniques possèdent la capacité de tuer la forme levure de *C. albicans in vitro* (Marquis, Lewandowski et al. 2006).

Kératinocytes

Les kératinocytes ne sont pas qu'une barrière physique contre les pathogènes de la muqueuse buccale, mais ils sont aussi la source principale d'une grande variété de cytokines dans l'épithélium (Ansel, Perry et al. 1990). Plusieurs études démontrent que l'activation des kératinocytes par des stimuli tels les allergènes de contact, les superantigènes, les radiations de type UVB ou la reconnaissance d'un pathogène par TLR déclenche la production des cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6, IL-8 et TNF- α (Grone 2002; Pivarcsi, Kemeny et al. 2004). L'IL-1 induit l'expression de la kératine6, diminue l'adhérence de bactéries aux kératinocytes et est une molécule chimiotactique. L'IL-6 induit la prolifération des kératinocytes, augmentant ainsi la vitesse de renouvellement de l'épithélium, tandis que l'IL-8 recrute les neutrophiles (Grone 2002). Les kératinocytes peuvent aussi produire des cytokines servant de facteur de croissance pour les lymphocytes T, l'IL-7 et l'IL-15 (Grone 2002). L'IL-7 aurait par ailleurs la capacité d'influencer la migration des lymphocytes T vers les ganglions lymphatiques, tandis que l'IL-15 serait responsable de la migration des

cellules inflammatoires vers l'épithélium (Grone 2002). Chez l'humain et la souris, les kératinocytes produisent de l'IL-12 et de l'IL-18, deux cytokines immunomodulatrices. La première dirige la réponse immunitaire vers Th1 et induit l'expression d'IFN- γ tandis que la seconde amplifie la réponse des kératinocytes à l'IFN- γ (Grone 2002). Chez la souris, les kératinocytes produisent également de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire qui dirige la réponse immunitaire vers Th2. Cependant, cela n'a pas lieu chez l'humain (Grone 2002). Les kératinocytes possèdent évidemment plusieurs récepteurs de cytokines, notamment les récepteurs de l'IL-4, IL-13 et IL-17. La présence d'IL-4 permet la production d'IL-6 en plus d'induire la prolifération des kératinocytes, tout comme IL-13, et IL-17 permet de moduler les effets qu'ont IL-4 et IFN- γ sur les kératinocytes (Grone 2002).

Les kératinocytes ont une activité fongicide directe contre *C. albicans*, qui peut être augmentée par la présence et la production d'IL-8, IL-1 ainsi que par la stimulation par les rayons UV (Szolnoky, Bata-Csorgo et al. 2001). Les mécanismes de cette activité fongicide consiste en l'activation de la synthase d'oxyde nitrique inductible (iNOS) produisant le NO auquel *C. albicans* est sensible, ainsi qu'à la production de l'antileukoprotéase et de β -defensine (Pivarcsi, Bodai et al. 2003; Pivarcsi, Kemeny et al. 2004). Ces trois mécanismes anti-*Candida* sont d'ailleurs sous le contrôle du promoteur NF- κ B, puisque la sulfasalazine, un inhibiteur connu de NF- κ B, inhibe la capacité des kératinocytes à tuer *C. albicans* (Pivarcsi, Bodai et al. 2003).

Afin de pouvoir exercer leur activité fongicide sur *C. albicans*, les kératinocytes doivent pouvoir détecter sa présence. À cette fin, les kératinocytes expriment plusieurs récepteurs de PAMPs, le TLR2, le TLR4 et une version du récepteur du mannose spécifique aux kératinocytes (KcMR) (Pivarcsi, Bodai et al. 2003). TLR2 et TLR4 ont déjà été mentionnés plus haut et sont connus comme permettant une reconnaissance de *C. albicans* et le déclenchement d'une réponse immunitaire (Chai, Netea et al. 2008). KcMR est un récepteur récemment découvert possédant une analogie de fonction avec le récepteur du mannose des macrophages (MMR) mais dont la masse moléculaire diffère (Pivarcsi, Kemeny et al. 2004). De plus, l'expression de KcMR et de TLR2 est augmentée chez les kératinocytes des couches

supérieures de l'épithélium (Pivarcsi, Kemeny et al. 2004). L'activation de TLR2 et TLR4 par *C. albicans* déclenche la voie de signalisation passant par MyD88 et IRAK et aboutissent à l'activation et à la translocation dans le noyau du facteur de transcription NF- κ B. NF- κ B est bien connu pour son activation de plusieurs gènes des réponses inflammatoires et immunitaires, dont IL-1, IL-6, IL-8, iNOS et les β -defensines qui sont produites par les kératinocytes pour combattre *C. albicans* (Pivarcsi, Bodai et al. 2003; Pivarcsi, Kemeny et al. 2004). Les réponses anti-*Candida* chez les kératinocytes requièrent donc une interaction entre TLR2, TLR4 et le champignon (Pivarcsi, Kemeny et al. 2004).

Cellules de Langerhans (CL)

Les cellules de Langerhans furent observées pour la première fois en 1868 par Paul Langerhans (Kaplan, Kissenpfennig et al. 2008). Il s'agit d'une sous-population de cellules dendritiques possédant la forme caractéristique étoilée de ces dernières et localisée dans les couches basales et suprabasales de l'épithélium pavimenteux stratifié (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004; Cunningham, Carbone et al. 2008). Les cellules de Langerhans peuvent sécréter de l'IL-12 et de l'IFN- γ et expriment à leur surface les molécules du CMH-I et du CMH-II, CD45, CD11c, CD11b, la langerine, CCR6 et la E-cadherine (Berger, Vasquez et al. 2006). La E-cadherine est particulièrement importante, car elle permet la création d'un réseau entre les cellules de Langerhans et les kératinocytes (Cunningham, Carbone et al. 2008). De plus, CCR6 permet la migration des cellules de Langerhans vers l'épithélium, grâce à la MIP3a produite par les kératinocytes (Berger, Vasquez et al. 2006). Les cellules de Langerhans expriment aussi TLR2 et TLR4 ainsi que le récepteur de lectine de type C (Cunningham, Carbone et al. 2008). Les cellules de Langerhans proviennent de la moelle osseuse et sont majoritairement de lignée myéloïde (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004; Berger, Vasquez et al. 2006). Les cellules de Langerhans provenant des monocytes périphériques nécessitent TGF- β , GM-CSF, IL-4 et le ligand de Notch δ -1 tandis que les cellules dendritiques provenant de ces mêmes précurseurs n'ont besoin que d'IL-4 et GM-CSF pour se différencier (Berger, Vasquez et al. 2006). La possibilité d'utiliser des monocytes

périphériques comme précurseurs permet de remplacer efficacement les cellules de Langerhans qui migrent vers les organes lymphoïdes secondaires afin d'y présenter des molécules antigéniques (Berger, Vasquez et al. 2006). Les cellules de Langerhans sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, ce qui leur confère, sous leur forme immature, une grande capacité d'effectuer la phagocytose ainsi que la macropinocytose des antigènes ou des corps apoptotiques des cellules du soi (Berger, Vasquez et al. 2006). La détection d'antigènes en présence de cytokines pro-inflammatoires déclenche l'activation des cellules de Langerhans, provoquant la diminution de E-cadherine et l'augmentation de l'expression de CCR7, ce qui provoque la migration de l'épithélium vers les organes lymphoïdes secondaires (Kaplan, Kissenpfennig et al. 2008). Durant cette migration, la cellule de Langerhans subit sa maturation en cellule présentatrice, en apprêtant et en exprimant les molécules antigéniques sur le CMH-I et CMH-II tout en augmentant l'expression des molécules de co-stimulation tel que CD54, CD58, CD80 et CD86 sur sa surface (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004; Kaplan, Kissenpfennig et al. 2008). Une fois dans les organes lymphoïdes secondaires, la présentation d'antigènes de *C. albicans* par le CMH-II en présence de IL-12 et IL-18 induit les cellules CD4+ vers une réponse cellulaire de type Th1, qui est protectrice contre *C. albicans* (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). Si les cellules de Langerhans sont capables d'induire une réponse immunitaire, elles sont aussi capables d'induire la tolérance en présentant des molécules du soi sur le CMH-I et CMH-II sans exprimer les molécules de co-stimulation (Banchereau and Steinman 1998).

Macrophages

Elie Metchnikoff fut le premier à reconnaître les macrophages comme des cellules phagocytaires pouvant jouer un rôle dans l'immunité d'un organisme (Martinez, Helming et al. 2008). Les macrophages résidents, de lignée myéloïde, sont le produit de la différenciation des monocytes de la circulation sanguine (Paul 2003). Les macrophages sont des cellules hétérogènes extrêmement plastiques, qui s'adaptent en fonction du tissu dans lequel ils résident. En effet, il existe un ensemble de sous-populations de macrophages résidents, les cellules de Kupffer dans le foie, les

ostéoclastes des os, les cellules microgliales du système nerveux central et les macrophages alvéolaires pulmonaires (Gordon 2003). Au niveau de la muqueuse buccale, les macrophages sont localisés principalement dans la *lamina propria*. Ces macrophages expriment une panoplie de récepteurs comme le CMH-II, CD11b, le récepteur Fc, le récepteur du mannose (MMR), Dectine-1, les récepteurs du complément, ainsi que les TLRs, dont TLR2 et TLR4, qui sont particulièrement importants dans la détection de *C. albicans* (Vazquez-Torres and Balish 1997; de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). De plus, le récepteur F4/80, exprimé uniquement chez la souris, permet une identification efficace des populations de macrophages murins (Hamann, Koning et al. 2007).

Afin d'activer et de polariser complètement un macrophage, deux signaux sont nécessaires : la détection d'un pathogène par les récepteurs et la présence de cytokines spécifiques (Martinez, Helming et al. 2008). Chez les macrophages, il existe deux programmes majeurs d'activation nommés M1 et M2 dans le but de suivre une nomenclature similaire à Th1 et Th2, ainsi qu'un programme de désactivation. Chacun des programmes est initié à l'aide de cytokines différentes et produit des effets différents (Fig.2).

Le programme d'activation classique (M1) est déclenché par la présence de pathogènes et d'IFN- γ (Mantovani, Sica et al. 2004). L'activation classique M1 augmente la capacité des macrophages à présenter des antigènes sur CMH-II et à produire de l'IL-12 et de l'IL-23. Les macrophages M1 produisent aussi du TNF- α , permettant le recrutement et l'activation des PMNs, causant ainsi une amplification de la réponse immunitaire innée (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). Les macrophages M1 produisent de l'H₂O₂ et du NO, puisque le métabolisme du précurseur de NO, l'arginine, est dirigé vers iNOS. De plus, ce programme d'activation classique augmente l'expression des récepteurs Fc et de TLR4, tout en augmentant les composants de la voie de signalisation de MyD88 (Mantovani, Sica et al. 2004). Sous le contrôle du programme d'activation classique, le macrophage devient donc une cellule effectrice de la réponse Th1.

Le programme d'activation alternatif, appelé M2, est amorcé par la présence d'IL-4 ou d'IL-13 (Mantovani, Sica et al. 2004). Il implique le facteur de transcription STAT6 (Martinez, Helming et al. 2008). Ce programme stimule la phagocytose, l'endocytose, l'autophagie et la fusion des macrophages en cellules géantes multinucléées, dont les effets immunologiques sont peu connus, tout en provoquant l'augmentation de l'expression du récepteur du mannose et du CMH-II à la surface du macrophage (Gordon 2003; Mantovani, Sica et al. 2004; Martinez, Helming et al. 2008). Le programme alternatif est impliqué principalement dans les réponses immunitaires de type Th2. Les macrophages polarisés M2 abaissent considérablement leur production de cytokines pro-inflammatoires tels que IL-1, IL-6 et TNF- α , mais ils présentent une production élevée d'IL-10 (Mantovani, Sica et al. 2004). Les macrophages M2 phagocytent et digèrent les déchets tissulaires, et favorisent l'angiogénèse des tissus après une infection (Mantovani, Sica et al. 2004).

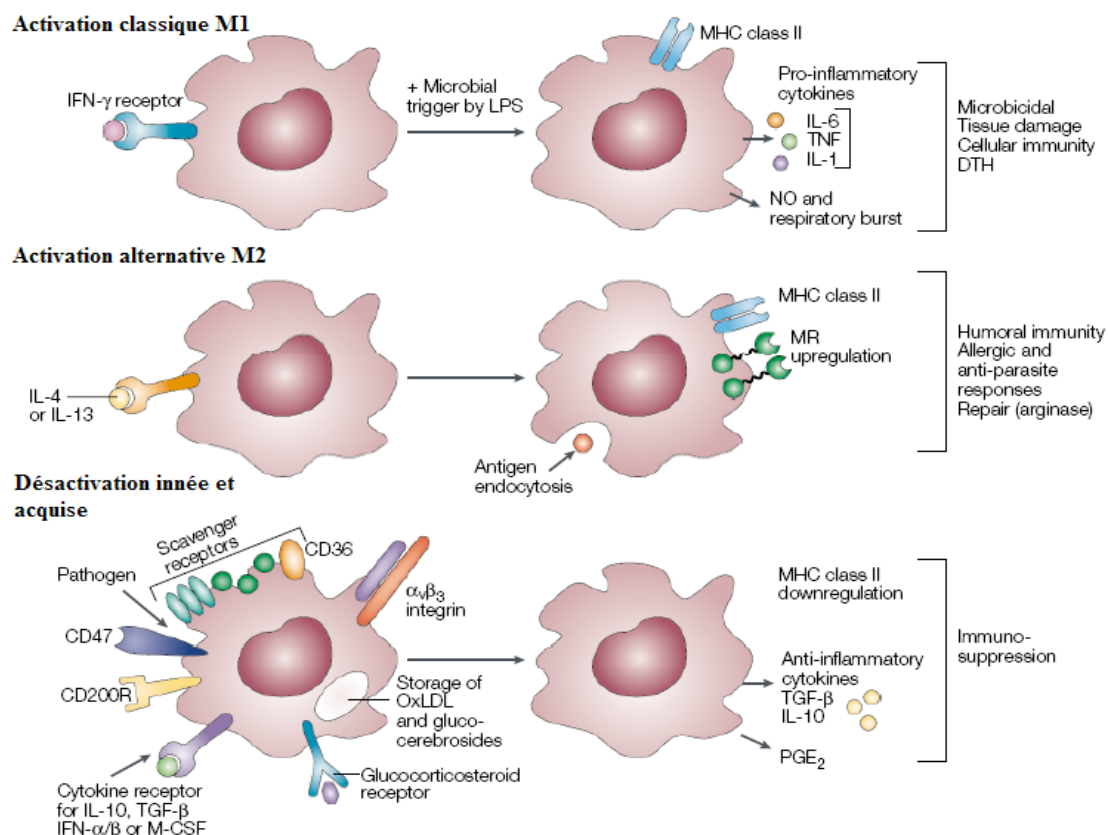


Figure 2. Les programmes d'activation classique (M1) et alternative (M2) ainsi que la désactivation des macrophages. Image adaptée de (Gordon 2003)

Le programme de désactivation, causé par l'IL-10, provoque l'anergie du macrophage. Il y a une désactivation de la poussée oxydative ainsi qu'un arrêt de la production des cytokines inflammatoires, particulièrement de TNF- α (Gordon 2003).

Le macrophage activé possède une activité fongicide contre la forme levure et la forme hyphe de *C. albicans* (Vazquez-Torres and Balish 1997; de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). Cependant, la forme hyphe de *C. albicans* est plus résistante au processus d'élimination par les macrophages que la forme levure (Vazquez-Torres and Balish 1997). L'activité fongicide contre *C. albicans* comprend un ensemble de mécanismes dépendants et indépendants de l'oxygène (Vazquez-Torres and Balish 1997). Les macrophages produisent des molécules fongicides comme les défensines et la calprotectine, mais l'élimination efficace de *C. albicans* serait due principalement à la production d'anion superoxyde (O_2^-), de peroxyde (H_2O_2) par la superoxyde dismutase (SOD) et de monoxyde d'azote (NO) par iNOS (Vazquez-Torres and Balish 1997; de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). Par ailleurs, des études démontrent que *C. albicans* déclenche la production de peroxyde chez les macrophages et que la présence de GM-CSF améliore la réponse anti-*Candida* et aide à son maintien à long terme (Vazquez-Torres and Balish 1997). Tout semble indiquer que les macrophages issus de l'activation classique sont plus efficaces pour l'élimination de *C. albicans*, ce qui concorde avec le fait qu'une réponse Th1 est protectrice.

Cellules NK (*Natural Killer*)

Les cellules NK font partie de la lignée des cellules lymphoïdes et sont principalement responsables de contenir les infections virales et les tumeurs avant l'apparition d'une réponse immunitaire spécifique et efficace (Murciano, Villamon et al. 2006). Les cellules NK, une fois activées par les cytokines pro-inflammatoires comme IL-2 et IFN- γ , produisent GM-CSF, TNF- α et IFN- γ (Beno, Stover et al. 1995; Murciano, Villamon et al. 2006). L'effet antifongique potentiel réside donc en la capacité de produire des cytokines activant les cellules phagocytaires. Cependant,

les cellules NK, activées ou non par IL-2 et IFN- γ , n'ont pas d'effets fongicides directs contre *C. albicans* et n'inhibent pas sa croissance (Beno and Mathews 1992; Beno, Stover et al. 1995; Fidel 2002). De plus, il a été démontré que *C. albicans* tué, sous sa forme levure ou hyphe, inhibe la production d'IFN- γ des cellules NK (Murciano, Villamon et al. 2006).

Lymphocytes T

Les lymphocytes T proviennent des cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse et migrent vers le thymus. C'est dans cet organe qu'ils subiront la prolifération et la différenciation en cellules T naïves exprimant chacune un récepteur TCR unique à un antigène. C'est aussi dans le thymus que sont éliminés les lymphocytes T auto-réactifs (Janeway and Travers 2003; Paul 2003). Les lymphocytes T périphériques expriment le récepteur CD3 sur leur surface et peuvent également exprimer la molécule CD8 ou la molécule CD4. De plus, les lymphocytes T CD4⁺ sont subdivisés en fonction des chaînes polypeptidiques formant leur récepteur TCR. Ainsi, il existe les cellules T $\alpha\beta$, qui consiste en la majorité des lymphocytes T CD4⁺, et les cellules T $\gamma\delta$ (Janeway and Travers 2003). Dans la muqueuse buccale, les lymphocytes T sont retrouvés seuls ou en petits groupes situés des deux côtés de la membrane basale et ils sont rarement retrouvés dans les couches supérieures de l'épithélium (van Loon, Krieg et al. 1989). La majorité de ces lymphocytes T expriment un phénotype de cellule T mémoire CD45R0⁺ (Colasante, Rosini et al. 1992; Pope 1999). Chez l'humain, le rapport entre les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans la muqueuse buccale est d'une cellule T CD4⁺ pour deux cellules T CD8⁺, alors que ce rapport est inversé chez la souris (van Loon, Krieg et al. 1989; Bolduc, Waterfield et al. 1990).

Le recrutement des lymphocytes T CD8⁺ lors d'une infection de la muqueuse est assuré par la production d'IL-8 provenant des kératinocytes. Même si les lymphocytes T CD8⁺ activés par IL-2 peuvent inhiber directement la croissance des hyphes de *C. albicans in vitro*, le rôle principal des CD8⁺ est de produire des cytokines améliorant les capacités antifongiques des PMNs et des macrophages

(Beno, Stover et al. 1995; de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). Par ailleurs, il a été démontré que les lymphocytes T CD8⁺ peuvent limiter l'infection buccale chronique à *C. albicans* chez la souris transgénique exprimant le génome du VIH-1 (Marquis, Lewandowski et al. 2006).

La production de cytokines permet aux lymphocytes T CD4⁺ d'orienter la réponse immunitaire vers Th1 (IL-2 et IFN- γ) ou Th2 (IL-4 et IL-5) (Cantorna and Balish 1991). Par exemple, la production d'IL-12, essentielle pour une réponse Th1, par les lymphocytes B, les cellules dendritiques, les macrophages et les PMNs induit la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ ainsi que la production de cytokines (Cantorna and Balish 1991; Farah, Elahi et al. 2002). En règle générale, les lymphocytes T $\alpha\beta$ sont plus nombreux que les lymphocytes T $\gamma\delta$ dans la muqueuse buccale, mais les cellules T $\gamma\delta$ y sont quand même plus présentes qu'en périphérie (Farah, Elahi et al. 2002). Une réponse médiée par les lymphocytes T est essentielle à la résistance contre plusieurs infections fongiques, dont la candidose (Romani 1999). En effet, des études réalisées chez la souris indiquent que la candidose orale ou gastro-intestinale déclenche une réponse à médiation cellulaire et que les lymphocytes T CD4⁺ sont essentiels à résistance au *C. albicans* (Romani 1999; Farah, Elahi et al. 2002; Ashman, Farah et al. 2004). De plus, on observe lors de ces mêmes infections un recrutement marqué des lymphocytes T $\gamma\delta$ à la muqueuse (Farah, Elahi et al. 2002; Ashman, Farah et al. 2004; de Repentigny, Lewandowski et al. 2004).

Deux sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ aux effets antagonistes, les cellules T régulatrices (Treg) et les cellules Th17 (Romani 2008), sont induites lors d'infections fongiques (Romani 2008). Les cellules Th17 sont différenciées à partir de lymphocytes T CD4⁺ en présence d'IL-6 et de TGF- β et expriment le facteur de transcription ROR γ t (Romani 2008). Chez l'humain, l'IL-23 est nécessaire à la prolifération des cellules Th17, tandis que chez la souris, l'IL-23 est nécessaire après la prolifération, afin de maintenir la population (Annunziato, Cosmi et al. 2009). Ces cellules produisent principalement de l'IL-17, qui exacerbe la réaction d'inflammation déclenchée par les PMNs (Romani 2008). Étonnamment, si la

cytokine IL-17 provoque une hausse de l'inflammation causée par les PMNs ainsi que leur recrutement, elle provoque aussi une baisse des capacités antifongiques effectrices de ces cellules, et cela même en présence d'IFN- γ , ce qui suggère que la voie de signalisation Th17 a préséance sur la voie Th1 (Romani 2008; Conti, Shen et al. 2009). Les cellules Th17 produisent aussi de l'IL-22, qui n'affecte pas les cellules du système immunitaire, mais plutôt les tissus environnant, permettant ainsi de jouer le rôle d'intermédiaire pour les réponses anti-inflammatoires et pro-inflammatoires des tissus (Zelante, De Luca et al. 2009). Les cellules Th17 sont importantes pour la défense immunitaire contre *C. albicans*. En effet, une étude indique que la production d'IL-17A par les cellules Th17 est essentielle pour la défense contre la candidose systémique tandis qu'une autre montre un effet inflammatoire pathologique de l'IL-17 dans un modèle de candidose de la muqueuse gastrique (Huang, Na et al. 2004; Conti, Shen et al. 2009). Par ailleurs, une étude récente indique que des souris déficientes en cellules Th17 ou au récepteur d'IL-17 démontrent une candidose oro-pharyngée sévère par rapport aux souris normales (Conti, Shen et al. 2009). Cette même étude dénote aussi que la production d'IL-17 est triplée lors d'une infection au *C. albicans* chez la souris et détermine que la candidose oro-pharyngée ne peut être résolue en l'absence de la signalisation par le récepteur de l'IL-17 (Conti, Shen et al. 2009). Les travaux sur les cellules Th17 étant relativement récents, certains chercheurs prônent la prudence quant aux effets des Th17 sur la candidose et que ces effets peuvent varier selon le modèle employé (Pirofski and Casadevall 2009). Ainsi, il convient de se rappeler que, contrairement aux humains, *C. albicans* n'est pas une espèce commensale chez la souris et que l'étude de la réponse immunitaire très tôt chez cette espèce représente probablement une réponse aigue face à un pathogène inconnu du système immunitaire (Pirofski and Casadevall 2009). La nature et la concentration de l'inoculum visant à provoquer la candidose chez la souris sont aussi remises en cause : si seule la forme hyphe de *Candida* déclenche la production d'IL-23 et la production de cellules Th17, les souris sont inoculés avec de fortes concentration de conidies (Pirofski and Casadevall 2009). Il conviendrait alors d'étudier les effets des cellules Th17 après la phase aigue de l'infection, au moment où les conidies de *C. albicans* ont germé en hyphes.

Les cellules T régulatrices (Treg) peuvent être soit induites ou naturelles. Les Tregs naturels proviennent du thymus et sont présents même en l'absence d'infection, tandis que les Tregs induits sont apparissent lors d'une infection (Romani 2008). Les Tregs sont différenciées à partir de cellules T CD4+ naïves, en présence de TGF- β et d'IL-2, et elles augmentent l'expression du facteur de transcription Foxp3 (Romani 2008). Le rôle des Tregs est la suppression des réponses immunitaires. Ces cellules limitent les dommages pouvant résulter d'une réponse inflammatoire excessive (Romani 2008). La réponse immunitaire face au *C. albicans* est affectée par les Tregs (Sutmuller, den Brok et al. 2006). En effet, le champignon induit une immunosuppression de la réponse immunitaire à son égard par la signalisation du TLR2 (Montagnoli, Bacci et al. 2002; Netea, Sutmuller et al. 2004). Ainsi, en présence de cellules dendritiques sécrétant de l'IL-10, *C. albicans* induit l'activation et la prolifération des Tregs par la stimulation directe du TLR2 présent chez ces cellules (Montagnoli, Bacci et al. 2002; Sutmuller, den Brok et al. 2006). Les Tregs induites par *C. albicans* produisent de l'IL-4, de l'IL-10 et du TGF- β (Montagnoli, Bacci et al. 2002). Malgré le fait que le rôle premier des Tregs soit de réduire ou de supprimer les réponses immunitaires de type Th1 ou Th2, leur présence et leur activité régulatrice sont essentielles lors d'une infection au *C. albicans* (Montagnoli, Bacci et al. 2002). En effet, la réduction de la réponse efficace de type Th1 par les Tregs permet l'induction de la tolérance, qui est nécessaire afin d'obtenir une protection immunitaire à long terme contre le champignon (Montagnoli, Bacci et al. 2002).

Lymphocytes B

Les lymphocytes B proviennent des cellules souches de la moelle osseuse, et expriment des anticorps d'isotype IgM lorsqu'ils sont immatures. Le passage du stade immature au stade naïf dans les organes lymphoïdes périphériques permet aux lymphocytes B d'exprimer aussi des anticorps d'isotype IgD à leur surface (Janeway and Travers 2003). La détection de l'antigène spécifique par le clone correspondant de lymphocytes B lui permet de se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps spécifiques, ou bien en cellules B mémoire, ce qui permet d'agir plus rapidement et

plus efficacement lors d'une deuxième infection par le même pathogène porteur de l'antigène détecté initialement (Janeway and Travers 2003).

La muqueuse buccale normale ne contient pas de lymphocytes B, qui semblent d'ailleurs jouer un rôle mineur dans la résolution des candidoses, puisque les anticorps seuls ne peuvent parvenir à l'élimination de *C. albicans* (van Loon, Krieg et al. 1989; Fidel 2002). Le rôle des anticorps anti-*Candida* est plutôt de favoriser l'opsonisation et la phagocytose (Fidel 2002). De plus, les patients atteints de déficiences acquises ou congénitales des lymphocytes B ne démontrent aucune susceptibilité accrue aux candidoses mucoales ou systémiques (Rogers and Balish 1980). Cependant, des études réalisées à l'aide de modèles animaux de la candidose démontrent que certains anticorps spécifiques à la protéine de 47 kDa de *C. albicans* ont un rôle protecteur dans la candidose systémique, et que les IgA de la muqueuse vaginale du rat ont aussi un rôle protecteur (Fidel 2002).

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

Le VIH-1 est un virus qui se transmet principalement lors de relations sexuelles. Contrairement à ce que l'on peut penser, même si les cas de transmission lors de relations homosexuelles sont fréquents, 85 % des cas d'infections au VIH-1 sont dues à des relations hétérosexuelles (Forsman and Weiss 2008). D'autres causes de transmission sont aussi rapportées, comme l'utilisation de matériel contaminé lors d'injections de drogues intraveineuses, la transmission verticale de la mère séropositive à un enfant lors de l'accouchement et l'allaitement maternel (Kourtis, Jamieson et al. 2007; Forsman and Weiss 2008). Cinq millions de nouveaux cas d'infection au VIH s'ajoutent chaque année aux 40 millions de personnes déjà infectées, dont un million habitent aux Etats-Unis (Paul 2003). Le plus gros bassin de personnes séropositives se retrouve en Afrique, avec environ 25 millions de personnes infectées, impliquant une personne sur quatre dans certains pays dont le Zimbabwe et le Botswana (Paul 2003). 20 millions de personnes sont déjà décédées à cause du SIDA, et cette maladie se répand rapidement en Inde, en Asie et en Europe de l'Est (Paul 2003).

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)

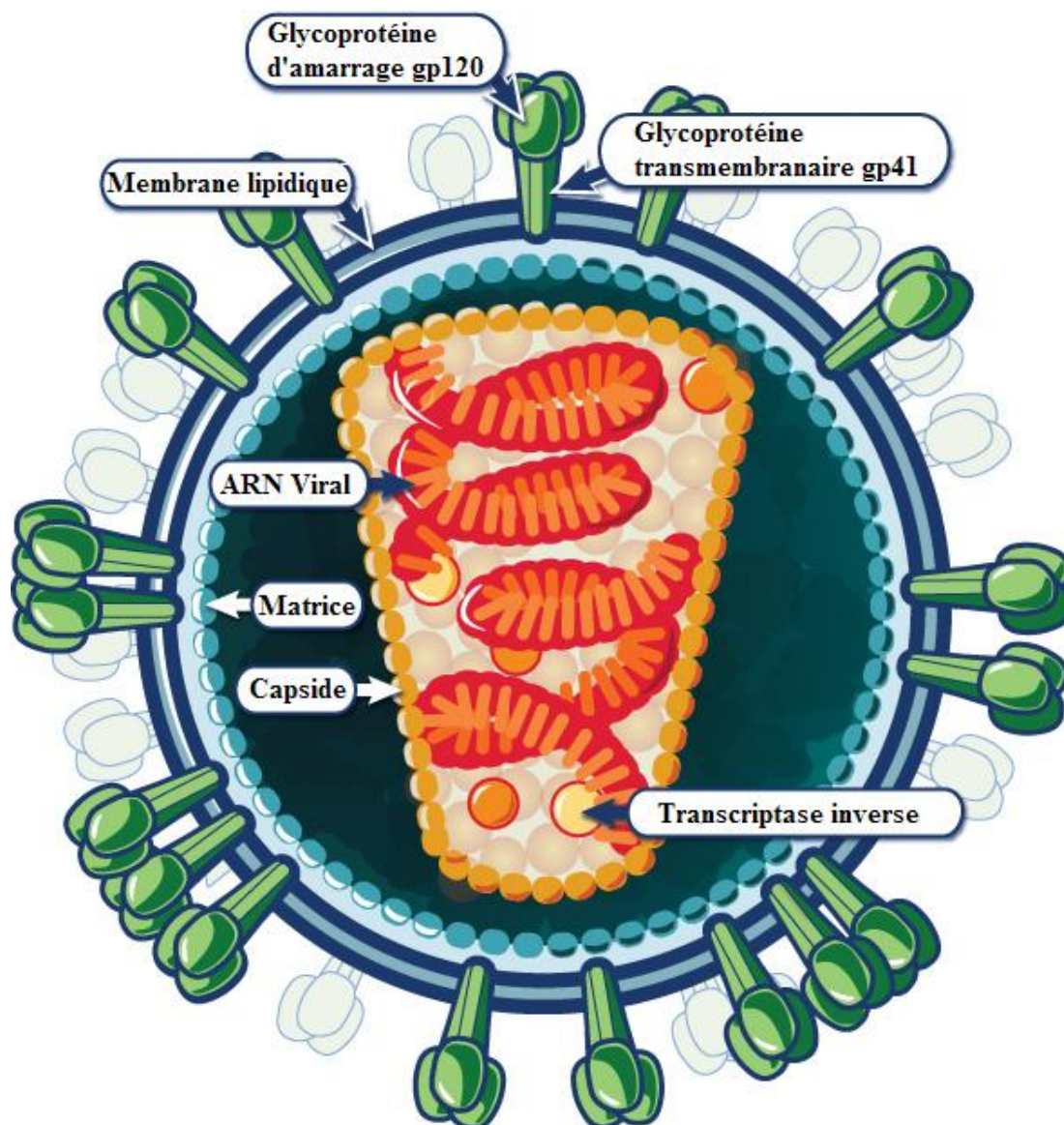


Figure 3 - Organisation structurale des virions du VIH-1. Image modifiée de www3.niaid.nih.gov, NIAID.

Le VIH-1 est un lentivirus possédant une capsid sphérique et faisant partie de la famille des rétrovirus qui fut identifié comme étant la cause du SIDA en 1983 (Paul 2003). Il s'agit d'un virus très plastique, qui possède plusieurs clades. La majorité des cas de SIDA en Amérique et en Europe sont causés par des virus appartenant au clade B, tandis que l'infection en Inde est causée par des virus appartenant au clade C (Forsman and Weiss 2008).

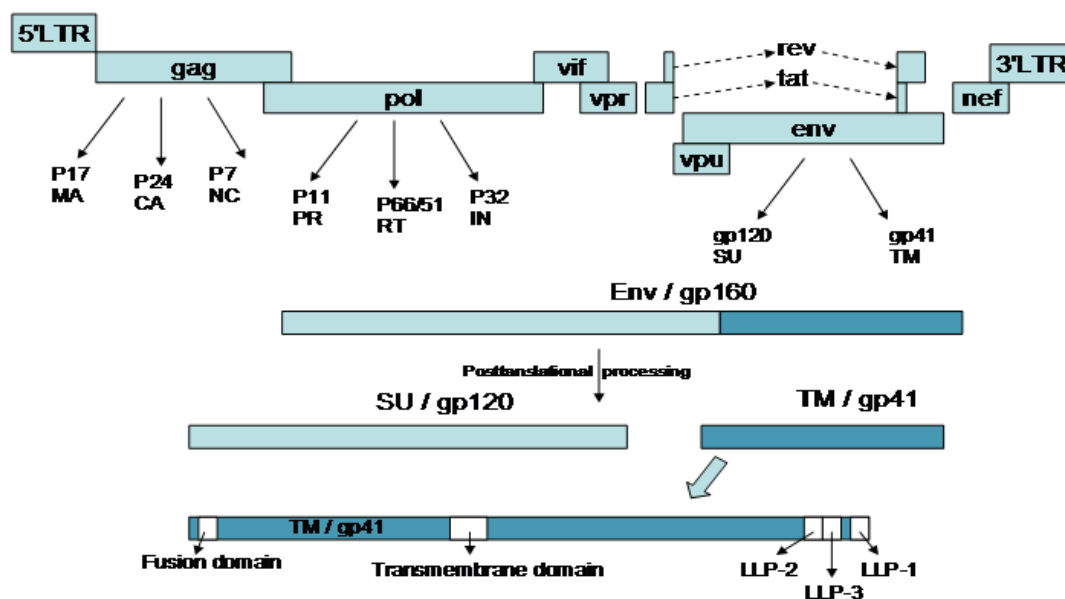


Figure 4. Le génome du VIH-1 (Costin 2007). L'organisation des gènes du VIH-1 ainsi que leur épissage transcriptionnel.

Le génome du VIH-1 est composé d'un ARN simple brin de 9.8kb qui existe en double copie dans la capside du virus codant pour trois gènes structuraux principaux (Fig. 4) (Paul 2003; Costin 2007). Le gène *gag* permet la production des précurseurs de la capside virale, soit les protéines de la capside, la nucléocapside et la matrice (Paul 2003). Les produits du gène *pol* sont la protéase, la transcriptase inverse, la RNase et l'intégrase, qui sont les enzymes virales utilisées lors de la réplication (Paul 2003; Costin 2007). Le gène *env* a pour produit le précurseur gp160, qui permet la production des protéines d'enveloppe gp41 et gp120 (Paul 2003; Costin 2007). La protéine *tat* favorise la transcription et la synthèse d'ARN viral en se liant en 5' aux ARN viraux, tandis que la protéine *rev* se lie aux transcrits viraux non épissés afin de permettre leur translocation hors du noyau de la cellule hôte (Paul 2003; Strebel 2003). En plus de favoriser la translocation de l'ADN viral double brin dans le noyau de la cellule hôte, *Vpr* stimule la transcription des gènes viraux à partir des sections LTR et bloque la cellule en phase G2 (Sherman, de Noronha et al. 2001; Paul 2003). Le gène *nef* diminue l'expression de la molécule du CMH-II et du CD4 sur la surface cellulaire, un effet amplifié par *vpu*, qui permet la dégradation des molécules CD4 et la relâche des particules virales (Montal 2003; Paul 2003; Costin 2007). La protéine

vif protège le génome viral contre l'activité de APOBEC3G, une enzyme pouvant être encapsidée par erreur et causant des mutations dans l'ARN viral simple brin, en marquant cette enzyme pour la dégradation dans le protéasome (Paul 2003).

Le tropisme du VIH cible principalement les lymphocytes T CD4+, les macrophages et les cellules dendritiques de lignée myéloïde et plasmacytoïde (Forsman and Weiss 2008). Contrairement aux cellules T CD4+ qui ne survivent que quelques heures après que le VIH y soit entré, les macrophages et les cellules dendritiques peuvent survivre des jours et des mois, ce qui en fait d'excellents réservoirs viraux résistants à la thérapie antirétrovirale (Forsman and Weiss 2008). La molécule CD4+ est une protéine d'amarrage de haute affinité pour le VIH, tandis que CCR5 ou CXCR4 agissent comme co-récepteurs pour la fusion membranaire (Forsman and Weiss 2008). Le VIH possède un tropisme envers CCR5 ou CXCR4 et certains virus ont un tropisme double, car ils peuvent lier les deux molécules. La majorité des primo-infections sont causées par des virus ayant un tropisme pour CCR5 et un changement de tropisme vers CXCR4 survient plus tard dans le cadre de la progression de la maladie chez 50 % des cas d'infections par des virus VIH-1 de clade B (Forsman and Weiss 2008).

La progression d'une infection au VIH vers la phase SIDA s'effectue en plusieurs étapes. La première, la primo-infection, est caractérisée par la déplétion des lymphocytes T CD4+ et une grande charge virale (Forsman and Weiss 2008). Les dommages de la primo-infection sont concentrés principalement au tissu lymphoïde intestinal (Forsman and Weiss 2008). Suite à la primo-infection, on assiste à une baisse marquée de la charge virale causée par l'apparition de lymphocytes T CD8+ spécifiques au VIH pouvant éliminer en partie les cellules infectées, ainsi que par la déplétion des cellules T CD4+ CCR5+ créant un manque de nouvelles cibles pour le virus (Forsman and Weiss 2008). Il s'agit du début de la période asymptomatique, durant laquelle le renouvellement journalier des lymphocytes T CD4+ est encore suffisant pour maintenir l'immunité (Forsman and Weiss 2008). La phase asymptomatique dure en moyenne 9 ans, mais il existe des progressions rapides

d'environ 5 ans et des progressions à long terme qui peuvent durer plus de 15 ans (Forsman and Weiss 2008). Cependant, suite à l'activation chronique causée par le VIH, le système immunitaire finit par s'épuiser et il ne parvient plus à renouveler les lymphocytes T CD4+ efficacement. Lorsque le nombre de lymphocytes T CD4+ chute à moins de 200 cellules par microlitre de sang périphérique, cela marque le début de la phase SIDA et les infections opportunistes font leur apparition (Forsman and Weiss 2008).

Les perturbations du système immunitaire causées par l'infection au VIH

L'infection au VIH cause des perturbations de l'immunité au niveau de la muqueuse buccale (Challacombe and Naglik 2006). La perturbation la plus évidente est la déplétion sévère des lymphocytes T CD4+. Ces cellules présentent aussi des perturbations majeures de leurs voies de signalisations intracellulaires, puisque le VIH-1, en particulier le produit du gène *nef*, active les voies du TCR et du calcium ainsi que AP-1 (Percario, Olivetta et al. 2003). La majorité des cellules de Langerhans sont déplétées par le VIH et les cellules survivantes démontrent des défauts de maturation tels que la présence réduite d'organelles, une baisse marquée de l'expression des molécules du CMH-I et CMH-II ainsi qu'une diminution de la production des cytokines IL-12 et IFN- γ (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). À l'instar des cellules de Langerhans, les macrophages sont un des premiers types de cellules entrant en contact avec le VIH et ils démontrent des défauts de présentation d'antigènes par les molécules du CMH ainsi que des problèmes de migration causés par des défauts des mécanismes de chimiotactisme (Polyak, Chen et al. 1997; de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). Cependant, les macrophages ne subissent pas une déplétion. En effet, les macrophages infectés au VIH-1 résistent à la mort cellulaire et servent ainsi de réservoir viral (Vazquez, Greenwell-Wild et al. 2005). La protéine virale *nef* semble être une des actrices principales dans les disfonctions des macrophages, car *nef* induit un stade d'activation chronique chez le macrophage caractérisé par l'activation de NF- κ B et de STAT1, et l'augmentation de la sécrétion des protéines d'inflammation des macrophages (MIP) MIP-1 α et MIP-1 β , IL-1 β , IL-6 et TNF- α (Olivetta, Percario et al. 2003). La relâche de MIP-1 α et MIP-1 β dans le

milieu active STAT3, ce qui amplifie davantage l'activation des macrophages (Percario, Olivetta et al. 2003). Résider dans un macrophage activé est un avantage certain pour le VIH-1, car l'activation a pour résultat une amplification de la transcription du génome viral (Olivetta, Percario et al. 2003). De plus, la co-infection d'un macrophage par un pathogène opportuniste, comme *Mycobacterium avium*, et le VIH-1 augmente encore davantage la production virale (Vazquez, Greenwell-Wild et al. 2005). Les PMNs sont des cellules non-infectées par le VIH et leur recrutement ainsi que leurs fonctions effectrices semblent d'ailleurs très peu perturbées (Marquis, Lewandowski et al. 2006). En effet, les PMNs étaient bel et bien recrutés à la muqueuse buccale lors de la candidose et leurs capacités fongicides étaient encore fonctionnelles, dans un modèle murin chez la souris transgénique exprimant le génome du VIH-1 (Marquis, Lewandowski et al. 2006).

Les composants de la salive subissent aussi des perturbations. Les niveaux d'anticorps IgA dans la salive sont abaissés chez les patients en phase SIDA, mais les réponses immunitaires humorales semblent maintenues avant la phase SIDA (Challacombe and Naglik 2006). Aussi, la salive des patients infectés au VIH affiche un patron de cytokines correspondant à une réponse Th2, ce qui correspond bien au changement de réponse Th1 vers Th2 associé au SIDA (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004).

La candidose oro-pharyngée

Une des conséquences majeures des perturbations immunitaires causées par le VIH est l'apparition d'infections opportunistes dont la principale au niveau fongique est la candidose oro-pharyngée (COP) (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). La COP se présente sous deux formes distinctes, soit la forme pseudomembraneuse, qui est la plus fréquente, et la forme érythémateuse (Calderone 2002). La COP pseudomembraneuse est facilement reconnue par la présence de plaques blanches ou jaunes qui sont facilement enlevées pour révéler une surface rouge sous-jacente parfois accompagnée de saignement (Calderone 2002; Lopez-De-Blanc, Salati-De-Mugnolo et al. 2002).



Figure 5 – La candidose oro-pharyngée pseudomembraneuse (image tirée de www.HIVdent.org et appartenant au Dr. Steve Debbink, Centre de ressource pour le SIDA du Wisconsin)

Le diagnostic d'une COP pseudomembraneuse peut être établi en observant la présence d'hyphes dans les frottis provenant des lésions (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). L'apparition de plaques rougeâtres principalement au palais et à la surface dorsale de la langue sont des caractéristiques d'une COP érythémateuse, mais une biopsie est souvent essentielle afin d'établir un diagnostic (Lopez-De-Blanc, Salati-De-Mugnolo et al. 2002; de Repentigny, Lewandowski et al. 2004).



Figure 6 – La candidose oro-pharyngée érythémateuse (image tirée de www.HIVdent.org, © 1996-2000 David Reznik, D.D.S.)

La candidose oropharyngée s'accompagne de divers symptômes, comme une sensation de brûlure dans la bouche, une altération du goût, une xérostémie et parfois même de la difficulté à déglutir les aliments et les liquides (Calderone 2002; de Repentigny, Lewandowski et al. 2004). D'autres types de candidose peuvent aussi survenir chez un patient atteint d'infection au VIH, notamment la chéilite angulaire ou exfoliative et la candidose œsophagienne, cette dernière étant une complication fréquente de la COP (Calderone 2002; de Repentigny, Lewandowski et al. 2004; Mocroft, Oancea et al. 2005).

CHAPITRE 3 : LES MODÈLES MURINS ET L'ÉTUDE DE LA CANDIDOSE ORO-PHARYNGÉE

Un bon moyen d'analyser les perturbations du système immunitaire cellulaire lors d'une infection fongique est d'utiliser un modèle animal, car celui-ci, ainsi que son environnement, peuvent être contrôlés (Naglik, Fidel et al. 2008). Les petits mammifères, comme les souris, sont habituellement choisis car ils dénotent une certaine ressemblance immunologique et anatomique par rapport à l'être humain, tout en représentant une économie d'entretien et d'espace requis (de Repentigny 2004; Naglik, Fidel et al. 2008). De plus, des méthodes d'analyses facilement accessibles sont déjà au point pour les modèles murins et il est possible de générer des souris transgéniques ou *knockout* (KO) afin de reproduire des perturbations spécifiques du système immunitaire (de Repentigny 2004). Pour l'étude des candidoses oro-pharyngée, gastro-intestinale et vaginale, les modèles favorisés sont murins. Cependant, *C. albicans* n'est pas une espèce commensale chez la souris et il est donc plus ardu de les coloniser, d'où la nécessité d'un hôte dont l'immunité est compromise (de Repentigny 2004; Naglik, Fidel et al. 2008).

La première catégorie de modèles murins pour l'étude de la candidose implique des souris normales n'ayant pas de modifications génétiques, auxquelles ont fait subir un traitement exogène immunosuppresseur. L'immunosuppression à l'aide d'injections sous cutanées de cortisone, répétées plusieurs fois, permet d'établir, de façon reproductible, une infection de la muqueuse buccale à *C. albicans* et produit des résultats histologiques similaires à ceux observés chez les patients atteints de COP (Kamai, Kubota et al. 2001). Ce modèle est habituellement utilisé pour étudier l'efficacité de médicaments antifongiques (Kamai, Kubota et al. 2001). Un résultat similaire à la cortisone peut être obtenu par l'irradiation (800 rad) de la tête et du cou d'une souris (Farah, Hong et al. 2001). Les souris ainsi irradiées subissent une candidose orale plus sévère et plus longue que les témoins non-irradiés. Toutefois, l'irradiation seule n'est pas suffisante, car elle n'élimine pas les lymphocytes T CD4+ de la périphérie (Farah, Hong et al. 2001). En effet, les décomptes de lymphocytes T

CD4⁺ et CD8⁺ sont de retour à la normale 14 jours après l'irradiation, et il faut donc utiliser un anticorps anti-CD4 afin de réduire la réponse efficace contre *C. albicans* (Farah, Hong et al. 2001). Il est aussi possible d'induire une immunodéficience suffisante à l'établissement d'une infection orale persistante à *C. albicans* en injectant à des souris C57BL/6 un mélange du virus de la leucémie murine causant le développement du syndrome d'immunodéficience acquise murin (SIDAM) (Deslauriers, Cote et al. 1997). Cependant, malgré que les souris atteintes du SIDAM aient plusieurs des anomalies immunitaires associés au SIDA chez l'humain, le SIDAM progresse rapidement et ne possède pas de longue phase de latence (Deslauriers, Cote et al. 1997). Il est aussi possible d'étudier les candidoses vaginales à l'aide des souris maintenues dans un stade de pseudo œstrus créé par l'injection sous cutanée de concentrations supraphysiologiques ou quasi-physiologiques d'estrogène (Fidel, Cutright et al. 2000).

La seconde catégorie de modèles murins implique des souris ayant une immunodéficience congénitale. Les souris « nude » (nu/nu) sont athymiques, ce qui implique une déplétion congénitale de la majorité des lymphocytes de la rate et des organes lymphoïdes secondaires, sans toutefois affecter les macrophages et les PMNs de la périphérie (Farah, Elahi et al. 2002; Farah, Gotjamanos et al. 2002). Les souris nu/nu sont donc déficientes en nombre et en fonction des lymphocytes T, créant ainsi une maladie analogue au syndrome de DiGeorge chez l'humain (Farah, Elahi et al. 2002). Les souris nu/nu ne parviennent pas à éliminer une infection orale ou gastro-intestinale à *C. albicans*, ce qui permet l'établissement et l'étude d'une infection chronique de ces sites (Balish, Filutowicz et al. 1990). Toutefois, ces souris ne démontrent pas une sensibilité accrue à la candidose systémique (Balish, Filutowicz et al. 1990). Les souris « beige » (bg/bg) montrent, au niveau des granulocytes, des granules de taille anormale générées par une régulation défectueuse du trafic des vésicules, ce qui constitue un phénotype homologue au syndrome de Chediak-Higashi chez l'humain (Blume, Padgett et al. 1969; Kaplan, De Domenico et al. 2008). Les souris bg/bg ont une susceptibilité accrue aux infections systémiques causées par *C. albicans* (Cantorna and Balish 1990). Plusieurs déficiences

immunitaires congénitales peuvent être présentes chez la même souris. Ainsi, les souris bg/bg nu/nu sont dépourvues de lymphocytes T et possèdent des PMNs défectueux, ce qui cause une grande susceptibilité naturelle aux infections mucoales et systémiques (Cantorna and Balish 1990).

La troisième catégorie comprend l'ensemble des souris *knockout*. Le *knockout* peut permettre d'éliminer une population cellulaire spécifique, comme c'est le cas chez les souris TCR KO et CD4 KO. Ces souris sont respectivement déficientes pour l'ensemble des lymphocytes T, ou uniquement des lymphocytes T CD4⁺ (Jones-Carson, Vazquez-Torres et al. 2000; Wormley, Cutright et al. 2003). Ces souris démontrent une susceptibilité accrue à l'établissement de COP (Jones-Carson, Vazquez-Torres et al. 2000). Il est aussi possible d'éliminer un récepteur cellulaire sans toutefois éliminer une population, comme pour la souris TLR4 KO. Cette souris illustre une diminution du recrutement des PMNs et une altération de l'expression des chimiokines causant une prolifération de *C. albicans* dix fois supérieure à celle observée chez les souris témoins (Netea, Van Der Graaf et al. 2002). À l'inverse de la souris TLR4 KO, la souris Fas KO présente une augmentation du recrutement des PMNs et possède un taux de mortalité plus faible lors de candidoses systémiques (Netea, van Der Meer et al. 1999). Les cytokines sont des cibles de choix pour les souris *knockout*. Plusieurs *knockout* ont été testés, notamment pour les cytokines IFN- γ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12 et IL-18 (de Repentigny 2004). Les souris KO pour IFN- γ , IL-4, IL-6 et IL-18 démontrent toutes une susceptibilité accrue aux candidoses systémiques, tandis que les souris IL-10 KO y sont plus résistantes (Balish, Wagner et al. 1998; van Enckevort, Netea et al. 1999; Vazquez-Torres, Jones-Carson et al. 1999; Netea, Vonk et al. 2003).

La quatrième catégorie de modèles animaux de la candidose comprend les souris transgéniques. La COP étant l'infection la plus commune chez les patients atteints du VIH-1, il est pertinent de tenter d'en reproduire les effets chez des souris transgéniques exprimant diverses constructions du génome du VIH-1. La plupart des premières souris transgéniques exprimant le génome du VIH-1 dans certains tissus

pouvaient développer des lésions locales dont la pathologie était similaire chez les patients infectés par le virus (Klotman, Rappaport et al. 1995; Hanna, Kay et al. 1998). Cependant, aucune souris transgénique n'exprimait les atteintes pathologiques et les déficiences immunitaires caractéristiques du SIDA (Klotman, Rappaport et al. 1995; Hanna, Kay et al. 1998).

Il existe maintenant des souris transgéniques, C3H CD4C/HIV, construites et caractérisées au laboratoire du Dr. Paul Jolicoeur (IRCM) permettant l'étude de la COP dans le cadre de l'infection au VIH-1 (Hanna, Kay et al. 1998). Le transgène est construit en utilisant la séquence entière ou partiellement mutée du génome du VIH-1, ainsi que le promoteur humain de la molécule CD4 et de l'*enhancer* CD4 murin (Fig. 7) (Hanna, Kay et al. 1998). La combinaison du promoteur humain et de l'*enhancer* murin permet d'exprimer le génome du VIH-1 chez les populations cellulaires normalement infectées par le VIH-1 chez l'humain, soit les lymphocytes T CD4⁺ matures, les lymphocytes T immatures du thymus, les macrophages et les cellules dendritiques (Hanna, Kay et al. 1998). Ces souris transgéniques subissent un amaigrissement, ont des organes lymphoïdes atrophiés, montrent une perte graduelle des lymphocytes T CD4⁺ et des cellules dendritiques matures, mais une accumulation de cellules dendritiques immatures (Hanna, Kay et al. 1998; Poudrier, Weng et al. 2003). De plus, on observe chez ses souris des néphrites tubulo-interstitielles et des pneumonies interstitielles, le tout formant une maladie très similaire au SIDA et associée à une mort prématurée (Hanna, Kay et al. 1998). Des études chez ces souris transgéniques ont aussi permis de déterminer qu'il y a une surexpression de Fas et de Fas ligand et une augmentation de l'apoptose des lymphocytes T, deux phénomènes aussi observés chez les patients atteints d'infection au VIH (Priceputu, Rodrigue et al. 2005). Le degré de sévérité de cette maladie apparentée au SIDA est directement associé au niveau d'expression du transgène dans les cellules ciblées. Un niveau d'expression supérieur résulte en une progression pathologique plus rapide, ce qui concorde bien avec les études chez les patients séropositifs indiquant que de haut taux de réplication virale mènent à la progression rapide de l'infection vers la phase SIDA (Hanna, Kay et al. 1998).

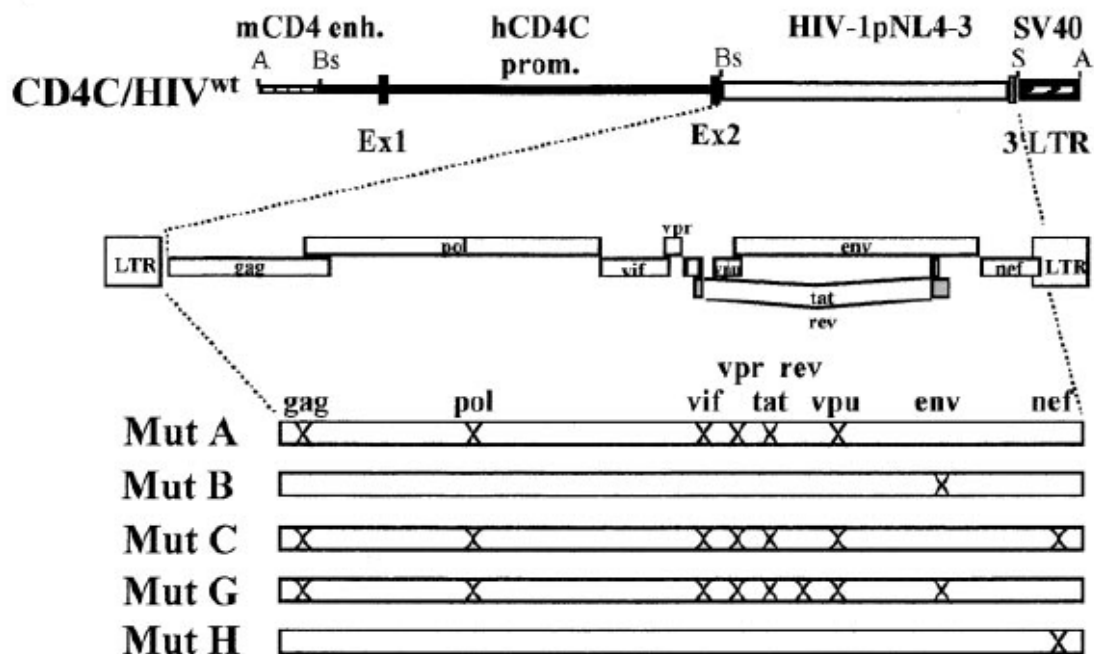


Figure 7. Diverses constructions du transgène du VIH-1 produites au laboratoire du Dr. Paul Jolicoeur. Image tirée de (Hanna, Kay et al. 1998) Notez l'utilisation du promoteur CD4C humain. Les gènes marqués d'un X sont inactivés.

Plusieurs constructions ont été produites au laboratoire du Dr. Paul Jolicoeur en mutant les gènes du VIH-1 (Fig. 7). Ainsi, la souris transgénique CD4C/HIV^{MutA} exprime les gènes nef, rev et env du VIH-1, tandis que la souris CD4C/HIV^{MutG} exprime nef uniquement (Hanna, Kay et al. 1998). Les gènes non mentionnés sont mutés afin d'être non-fonctionnels. Les souris transgéniques exprimant certains gènes du VIH-1 de façon sélective ont par ailleurs une durée de vie supérieure aux souris CD4C/HIV^{WT} (Hanna, Kay et al. 1998; Hanna, Kay et al. 1998). L'étude de la souris CD4C/HIV^{MutG} a permis de déterminer que le gène nef nécessaire et suffisant pour l'établissement de la maladie imitant le SIDA et que les lymphocytes T exprimant nef sont dans un état d'activation chronique due à l'augmentation de la phosphorylation des molécules impliquées dans la voie de signalisation du TCR (Hanna, Kay et al. 1998).

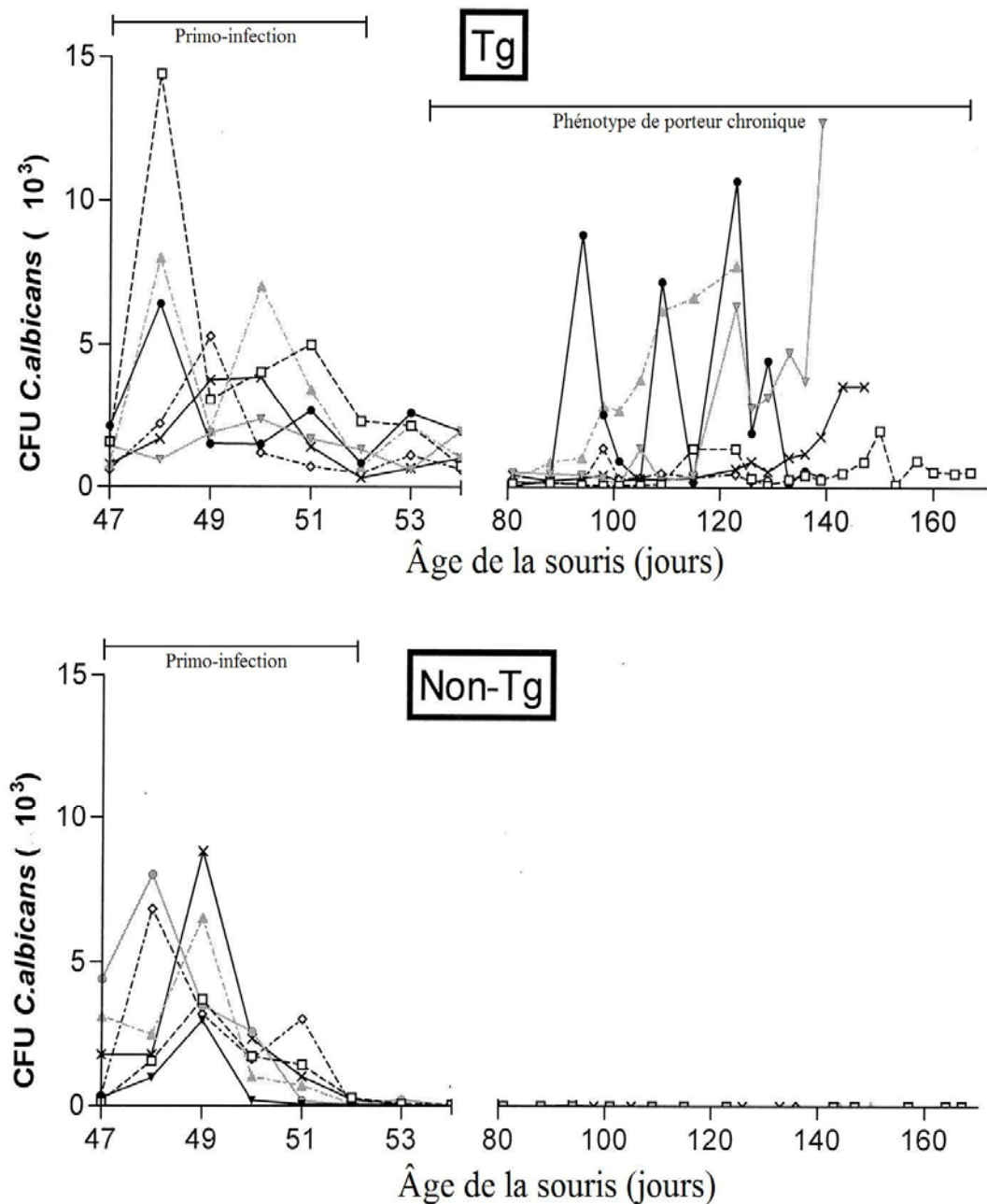


Figure 8- Charge buccale de *C. albicans* chez la souris transgénique et non-transgénique, image tirée de (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004)

La souris transgénique CD4C/HIV^{MutA} est présentement utilisée au laboratoire du Dr. Louis de Repentigny. L'infection de cette souris au *C. albicans* permet d'établir une COP persistante dont la pathologie est très similaire à celle observée chez les patients atteints d'infection au VIH (de Repentigny, Aumont et al. 2002). L'infection de la muqueuse buccale de ces souris par *C. albicans* résulte tout d'abord en une primo-

infection comportant une charge buccale élevée du champignon (Fig. 8). La charge buccale de *C. albicans* diminue ensuite, sans disparaître, ce qui établit un phénotype de porteur chronique qui est absent chez la souris non-transgénique (Fig. 8). Ce phénotype est maintenu jusqu'à une dernière hausse de la charge buccale de *C. albicans* précédant de près la mort prochaine de l'animal (de Repentigny, Aumont et al. 2002). Les coupes histologiques de la muqueuse buccale et de l'œsophage permettent d'ailleurs de constater que les hyphes de *C. albicans* pénètrent dans les strates supérieures de l'épithélium, ce qui est identique aux résultats d'examens pathologiques réalisés chez les patients atteints d'infection au VIH (de Repentigny, Aumont et al. 2002).

HYPOTHÈSES

La COP est une infection fongique opportuniste fréquente chez les individus infectés au VIH-1, résultant de perturbations des fonctions immunitaires dont la principale est la diminution progressive des lymphocytes T CD4+. Les fonctions immunitaires résiduelles semblent toutefois suffisantes afin de prévenir la propagation de *C. albicans* aux organes profonds.

Nous proposons les hypothèses suivantes à propos de la réponse macrophagiques au *C. albicans* chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutA} exprimant une partie du génome du VIH-1 :

1. Les souris transgéniques CD4C/HIV^{MutA} ont une ou plusieurs altérations quantitatives ou fonctionnelles des macrophages empêchant ceux-ci d'éliminer efficacement *C. albicans*.
2. Le nombre de macrophages dans la muqueuse buccale est réduit chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutA}, infectée ou non au *C. albicans*.
3. La production de H₂O₂ par les macrophages en réponse au *C. albicans* est réduite par l'expression du transgène.
4. La production de cytokines par les macrophages provenant de souris transgéniques CD4C/HIV^{MutA} est altérée par l'expression du transgène.

CHAPITRE 4 : MATÉRIEL ET MÉTHODES

Modèle animal

Les souris transgéniques (Tg) CD4C/HIV^{MutA} sont de lignée génétique C3H, et expriment les produits fonctionnels des gènes nef, rev et env du VIH-1. Les souris témoins non-transgéniques (non-Tg) sont aussi de lignée C3H. Ces souris sont certifiées dépourvues de pathogènes et sont hébergées dans des micro-isolateurs stériles situés à l'animalerie stérile de l'Université de Montréal. La température, l'humidité et le cycle lumineux des salles contenant les micro-isolateurs sont contrôlés. La colonie est maintenue par Mme Francine Aumont, du laboratoire du Dr. Louis de Repentigny. La reproduction est assurée par des mâles transgéniques provenant de la colonie mis en contact avec deux jeunes femelles C3H provenant de la compagnie Harlan (www.harlan.com). Les mâles reproducteurs sélectionnés ne doivent pas avoir d'abcès, ni provenir de parents ayant eux-mêmes des abcès. La présence du transgène chez les souris individuelles de la progéniture est détectée par PCR utilisant des oligonucléotides spécifiques. L'observation des produits du PCR sur gel de polyacrylamide permet la détection d'un ou deux produits d'amplification, correspondant respectivement aux souris non-transgéniques ou transgéniques. Lors de l'exécution du protocole d'infection au *C. albicans*, les souris Tg et non-Tg infectées sont gardées en isolation dans une pièce différente des souris non-infectées et de la colonie, afin d'éviter les contaminations.

Dans l'ensemble des expériences, un groupe de souris est composé de 5 ou 6 individus des deux sexes. Les groupes sont composés selon trois critères : l'âge des souris (jeunes ou vieilles), l'infection au *C. albicans* (infectées ou non-infectées) et la présence du transgène (Tg ou non-Tg). Les souris sont prêtes pour le protocole expérimental lorsqu'elles atteignent la maturité ce qui correspond à 42 jours après la naissance. Par la suite, une souris « jeune » est infectée durant 7 jours (souris âgée de 49 jours à la fin de l'infection) tandis qu'une souris « vieille » est infectée durant une période de 70 jours (souris âgée de 112 jours à la fin de l'infection). Puisqu'il est

pratiquement impossible d'obtenir des souris exactement du même âge, un écart de 14 jours est toléré à partir de l'âge de maturité.

Infection des souris au *Candida albicans*

La souche utilisée est *C. albicans* LAM-1 et elle est conservée à -80 °C. La souche LAM-1 provient originalement du sang d'un patient atteint de candidose systémique (Lacasse, Fortier et al. 1990). Deux jours avant l'inoculation des souris, la souche de *C. albicans* est dégelée etensemencée par striation sur une gélose Sabouraud-dextrose. Cette gélose sera mise en incubation à une température de 30 °C pour une durée de 24 heures. Quelques colonies sont ensuite prélevées sur la gélose et mises en culture dans deux tubes contenant 5 mL de bouillon Sabouraud-dextrose. Ces tubes sont incubés sous agitation constante pendant une nuit entière à 30 °C, ce qui permet l'obtention de blastoconidies en phase de croissance exponentielle. Deux lavages avec 5 mL de PBS stérile (10 mM, pH 7,4) à l'aide d'une centrifugeuse Jouan CR3i (800 x g, 9 minutes) sont alors effectués. Les deux culots sont ensuite resuspendus dans 2 mL de PBS stérile. Les deux suspensions sont combinées dans un seul tube et un décompte cellulaire à l'hématimètre permet d'en déterminer la numération. L'établissement d'une infection nécessite 1×10^8 cellules de *C. albicans*. Le volume de suspension requis est calculé et transféré dans des tubes Eppendorf dont la quantité correspond au nombre de souris à inoculer. Les tubes Eppendorf sont centrifugés sur mini centrifugeuse (Eppendorf Centrifuge 5415C, 16 000 x g, 5 minutes) et les surnageants sont aspirés pour ne laisser que les levures, qui sont alors prêtes à l'inoculation.

L'inoculation des souris se déroule sous les hottes biologiques de l'animalerie stérile et nécessite une anesthésie générale obtenue par une injection intra-péritonéale de 100 µl d'une préparation de kétamine/xylazine (1,5 mL de kétamine 100 mg/mL de chez Bioniche, Belleville, ON, 0,1 mL de xylazine 100 mg/mL de chez Bimeda-MTC, Cambridge, ON et 8,5 ml de solution saline stérile). En plus de réduire l'inconfort occasionné à l'animal, cette anesthésie est nécessaire afin de prévenir la déglutition de l'inoculum, et ainsi prolonger le temps de contact entre *C. albicans* et

la muqueuse buccale. Un écouvillon stérile muni d'un embout d'alginat de calcium (les Calgiswabs de Puritan) est utilisé pour prélever *C. albicans* des tubes Eppendorf et inoculer toutes les surfaces de la cavité buccale ainsi que la langue. Les souris sont âgées de 6 à 8 semaines lors de l'infection et demeurent en isolation jusqu'au sacrifice, soit 7 ou 70 jours après l'infection.

Décompte des unités formatrices de colonies (CFUs) de la muqueuse buccale

Afin de pouvoir faire le suivi de la charge buccale de *C. albicans* chez les souris, des décomptes de CFUs sont effectués à intervalles réguliers. Les décomptes sont effectués quotidiennement pour les infections de 7 jours et une fois par semaine pour les infections de 70 jours. La souris est immobilisée soigneusement dans la main gauche, et on frotte toute la cavité buccale à l'aide d'un écouvillon stérile (Calgiswabs). L'écouvillon est ensuite déposé dans 2 mL de solution de Ringer (voir Annexe 1). Après une agitation de 5 secondes sur un vortex, 200 µL de la solution sont déposés et étendus sur une gélose Sabouraud-Dextrose sur laquelle on dépose au préalable 5 à 8 billes de verre stériles afin d'aider à bien étendre la suspension. Les géloses sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37 °C. Les unités formatrices de colonies de chaque Pétri sont ensuite comptées.

Prélèvement et préparation de la muqueuse buccale et du petit intestin

Les souris sont préalablement anesthésiées par une injection intra-péritonéale de kétamine/xylazine (100 µL par 10 g). Une fois les animaux complètement anesthésiés, on procède à la perfusion de PBS stérile (10 mM, pH 7,4) avec une aiguille 25G introduite dans le ventricule gauche tandis que le sang est expulsé par une entaille à l'oreillette droite. La perfusion est maintenue tant qu'il s'écoule du sang par l'entaille de l'oreillette droite. Cela évite de contaminer avec des cellules sanguines les cellules des muqueuses lors du prélèvement. Pour chacune des souris, la muqueuse buccale est prélevée en totalité, ainsi qu'un centimètre du petit intestin. Les tissus prélevés sont déposés dans 2 mL de HBSS (Gibco). La suite de la méthode étant identique pour la muqueuse buccale et le petit intestin, seule la procédure pour la muqueuse sera décrite. Les muqueuses sont transférées dans 3 mL de tampon de nettoyage (voir

Annexe 1) sont mises sous agitation lente durant 5 minutes à 37 °C pour ensuite être transférées dans 2 ml de RPMI (Gibco).

Les muqueuses transférées sont ensuite coupées en très petits morceaux de 2 à 3 mm de côté à l'aide d'un scalpel, afin de faciliter la digestion à l'aide de la collagénase. Lorsque les morceaux sont bien découpés, le contenu du Pétri est aspiré dans une pipette jetable de 5 mL et transféré dans un tube conique. L'ajout de 1 mL de RPMI contenant 1 % (m/v) de collagénase démarre la réaction de digestion dont la durée est d'une heure sous agitation lente à 37 °C. À toutes les 15 minutes, les échantillons sont manuellement agités plus fortement par des inversions brusques. La suspension cellulaire ainsi obtenue est passée dans un filtre de nylon de 80 µl afin d'en retirer les déchets de digestion, et les cellules sont recueillies par centrifugation (200 x g, 9 minutes). Les cellules récupérées sont resuspendues dans 2 mL de PBS (10 mM, pH 7,4) pour le petit intestin et 1 ml pour la muqueuse buccale. Les cellules sont ensuite transférées dans des tubes spécifiques au FACS à raison de 250 µl par tube. Les cellules contenues dans ces tubes sont maintenant prêtes à être marquées pour l'analyse par la cytométrie en flux.

Marquage des macrophages et cytométrie en flux (FACS)

Tableau I - Anticorps utilisés pour l'analyse des macrophages en cytométrie en flux

Anticorps	Fluorochrome	Source	No. de produit
I-A ^k	FITC	BD	553536
CD11c	FITC	BD	557400
CD11b	PerCP Cy5.5	BD	550993
CD45	PE	BD	553081
F4/80	APC	Caltag	MF48005
isotype	FITC	BD	559532
isotype	PerCP Cy5.5	BD	550764
isotype	APC	Caltag	R2a05

La détection des macrophages nécessite un marquage cellulaire à l'aide de plusieurs anticorps (Tableau I). On distribue les anticorps et les isotypes contrôles (Tableau II) dans des tubes individuels, puis on incube les échantillons à 4 °C durant 30 minutes

(Tableau II). La quantité d'anticorps ajoutés doit être suffisamment élevée afin de permettre une lecture fiable des résultats, malgré l'autofluorescence de la muqueuse buccale et du petit intestin. Les anticorps non fixés aux cellules sont retirés par deux lavages consécutifs au PBS. Les tubes 1 à 6 ainsi que les tubes 9 et 10 sont des contrôles servant aussi au calibrage de l'appareil, tandis que les tubes 7, 8, 11 et 12 contiennent les échantillons tests. Deux combinaisons de marqueurs sont employés pour déterminer le pourcentage de macrophages, soit $CD45^+$, $I-A^{k+}$, $CD11b^+$, $F4/80^+$ et $CD45^+$, $CD11c^-$, $CD11b^+$, $F4/80^+$. Les échantillons marqués sont analysés sur un appareil FACSCalibur (BD Biosciences) relié à un ordinateur pourvu du logiciel CellQuest.

Tableau II - Combinaisons d'anticorps utilisés pour l'analyse des macrophages en cytométrie en flux

Intestin		Muqueuse buccale	
Tube	Anticorps	Tube	Anticorps
1	Cellules seules	9	Cellules seules
2	CD45	10	CD45 + isotypes
3	CD45 + I-Ak	11	CD45 + I-Ak + CD11b + F4/80
4	CD45 + CD11b	12	CD45 + CD11c + CD11b + F4/80
5	CD45 + F4/80		
6	CD45 + isotypes		
7	CD45 + I-Ak + CD11b + F4/80		
8	CD45 + CD11c + CD11b + F4/80		

Prélèvement des cellules de l'exsudat péritonéal (PECs)

La récolte des PECs nécessite une anesthésie profonde causée par l'injection sous-cutanée (au niveau du cou) de 500 µl de kétamine/xylazine. Le travail s'effectue sous une hotte biologique, afin de prévenir les contaminations. La souris anesthésiée est fixée sur une planchette de travail et la peau couvrant l'abdomen est retirée délicatement à l'aide d'un scalpel. À l'aide d'une seringue de 10 mL et d'une aiguille de taille 22G, 8 mL de PBS froid stérile (10 mM, pH 7,4) sont injectés dans la cavité péritonéale. Bien masser l'abdomen durant l'injection permet la récolte de plus de cellules. À l'aide de la même seringue utilisée pour l'injection, retirer le plus possible de PBS de la cavité péritonéale, en faisant bien attention de ne pas percer les organes, puis retirer l'aiguille de la seringue et déposer doucement son contenu dans un tube

conique de 15 mL identifié au numéro de la souris. Le retrait de l'aiguille permet d'éviter d'endommager les cellules prélevées. Remettre ensuite une nouvelle aiguille afin de réinjecter dans l'abdomen la même quantité de PBS retirée précédemment, puis on récupère le plus possible de liquide.

Lorsque tous les prélèvements sont effectués, centrifuger les exsudats péritonéaux et resuspendre les culots dans 500 µl de solution de lyse des érythrocytes (voir Annexe 1). Tous les culots resuspendus d'un même groupe sont réunis dans un seul tube et centrifugés (200 x g, 9 minutes). Les cellules sont resuspendues dans 500 µl de RPMI modifié par souris. Un groupe contenant habituellement 5 souris, il faut donc resuspendre dans 2.5 mL de RPMI modifié.

Un décompte à l'hématimètre des cellules resuspendues dans le RPMI modifié permet de déterminer l'ajustement de volume nécessaire à l'obtention d'une densité finale de 2×10^6 cellules/mL. De cette suspension, on dépose 100 µl dans chacun des puits d'une microplaque de 96 puits (Corning, 3595) et on incube durant deux heures à 37 °C dans 5 % de CO₂, ce qui permet aux macrophages d'adhérer à la microplaque. Suite à l'incubation, deux lavages à l'aide de PBS stérile (10 mM, pH 7,4) permettent de retirer les cellules non-adhérentes des puits.

Quantification de la production de H₂O₂ par les macrophages péritonéaux

Les PECs prélevées tel que mentionné précédemment sont ré-incubées en présence de 5 % de CO₂ à une température de 37 °C durant 48 heures après l'ajout de 100 µl de Krebs Ringer Phosphate Glucose (K RPG, voir Annexe 1) et de 500 U d'IFN-γ (Cedarlane) par puits. La présence d'IFN-γ dans le milieu assure la différenciation en macrophages M1 producteurs d'H₂O₂ (Chiang, Chen et al. 2008). Les macrophages ainsi incubés sont lavés une fois et sont mis en présence de K RPG contenant de l'Amplex Red (Invitrogen, A22188) et de la peroxydase de raifort (HRP). Les puits contiennent également 4×10^4 conidies viables de *C. albicans* afin de détecter la production de H₂O₂ en réponse au champignon. Le contrôle positif de production de H₂O₂ contient 1µM de phorbol 12-myristate-13-acétate (PMA), tandis que le témoin

de production constitutive ne contient aucun activateur (Humphries and Yoshino 2008). La quantité de H_2O_2 produite est mesurée 90 minutes plus tard à l'aide d'un spectrophotomètre à la longueur d'onde de 570 nm.

La peroxydase de raifort catalyse une réaction 1 :1 entre l'Amplex Red et le H_2O_2 produisant la résorufine, une molécule stable pouvant être détectée par colorimétrie ou fluorescence. L'analyse nécessite une courbe standard composée de concentrations connues de H_2O_2 s'échelonnant de 0 à 10 μM .

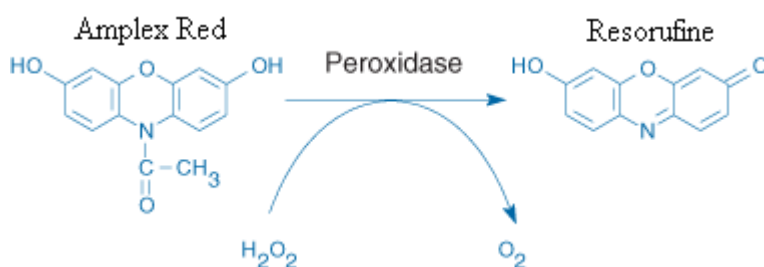


Figure 9 – Réaction de l'Amplex Red. En présence de peroxyde, la molécule d'Amplex Red est transformée en résorufine par la peroxydase. Figure adaptée de www.invitrogen.com

Production de cytokines par les macrophages péritonéaux

Les PECs sont incubées durant 48 heures à l'aide de la même méthode que pour la quantification de la production de H_2O_2 , mais sans IFN- γ , car la production des cytokines par les macrophages résidents pourrait être modifiée par la différenciation en macrophages M1. De plus, les conidies de *C. albicans* employées ici sont inactivées à la chaleur (incubation de 45 minutes à 95°C) afin de prévenir la formation de tubes germinatifs et la destruction des macrophages durant l'incubation de 48 heures. Les surnageants de chacun des puits correspondant à un groupe de souris sont récupérés et conservés à une température de -80 °C pour l'analyse cytométrique à l'aide des billes de capture (CBA).

L'ensemble CBA pour les cytokines inflammatoires murines permet la quantification de la production des cytokines suivantes : IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ , TNF- α et IL-

12p70 (BD Biosciences, 552364). Le principe du CBA est homologue à un ELISA « sandwich », c'est-à-dire que les billes portent à leur surface des anticorps spécifiques à une cytokine, et qu'un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome révèle la présence de cette cytokine sur la bille. L'intensité de la fluorescence émise par l'anticorps secondaire par rapport à une courbe standard permet de déterminer la concentration de la cytokine dans le surnageant.

Les surnageants de chacun des groupes de souris sont décongelés et incubés avec les billes du CBA en présence du réactif de détection durant deux heures à la température ambiante. Un lavage effectué grâce au tampon de lavage inclus dans la trousse CBA permet de récupérer les billes sur lesquelles les cytokines et le réactif de détection ont adhéré. Une fois les billes resuspendues dans 300 µl de tampon de lavage, il est possible d'effectuer la lecture sur le FACSCalibur (BD Biosciences). Le logiciel BD CBA permet l'analyse des données obtenues.

CHAPITRE 5 : RÉSULTATS

Infection des souris au *C. albicans*

Au cours de l'expérience sur la quantification des macrophages, quatre groupes de souris Tg CD4C/HIV^{MutA} ou non-Tg, jeunes ou vieilles sont infectés au *C. albicans*. La charge buccale moyenne de ces groupes est présentée aux figures 10 et 11.

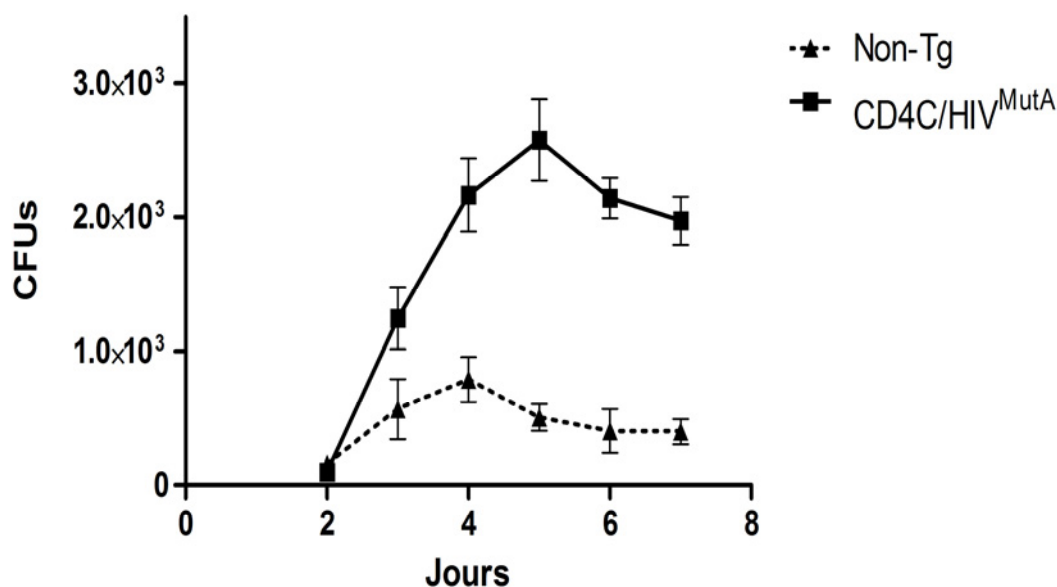


Figure 10 – La primo-infection chez les souris Tg et non-Tg. Charges buccales moyennes \pm l'écart type de *C. albicans* observées sur une période de 7 jours. Le jour 1 correspondant au jour de l'infection, il n'y a aucune CFU de mesurée.

La phase de primo-infection survient au cours des 7 premiers jours après l'inoculation buccale de *C. albicans*. Cette primo-infection est caractérisée par un pic de la charge buccale de $2,6 \times 10^3$ CFUs pour les souris Tg et de $8,6 \times 10^2$ CFUs pour les souris non-Tg (Fig. 10). Le pic de la charge buccale au cours de la primo-infection survient plus tôt et est moins élevé chez les souris non-Tg que chez les Tg. Au jour 7 après l'inoculation, les souris non-Tg montrent déjà une charge de *C. albicans* très réduite, tandis que les souris Tg maintiennent une charge buccale élevée, entamant ainsi le début de la phase de porteur chronique.

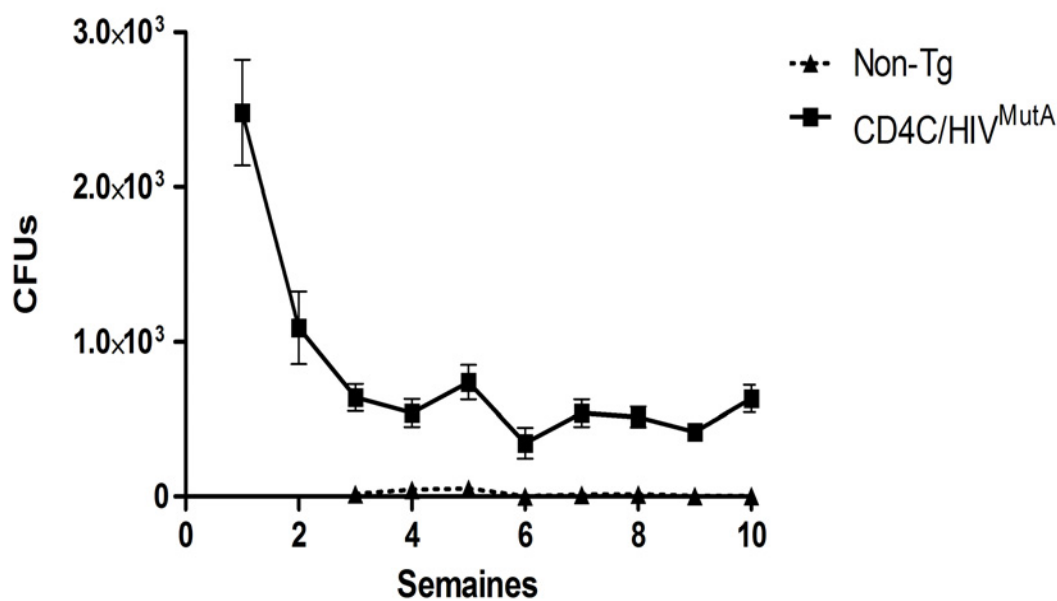


Figure 11 – Infection chronique au *C. albicans* chez les souris Tg. Charges buccales moyennes \pm écart type de *C. albicans* chez les souris Tg et non-Tg, sur une période de 10 semaines. La charge buccale des souris non-Tg est pratiquement nulle durant cette période.

Le phénotype de porteur chronique chez les souris Tg est facilement observé lors d'une infection sur une période de 10 semaines (Fig. 11). Par contre, dès la troisième semaine, la charge buccale de *C. albicans* chez les souris non-Tg est pratiquement nulle.

Quantification des macrophages

Les macrophages sont quantifiés dans la muqueuse buccale et le petit intestin de plusieurs groupes de souris (Fig. 12). Huit groupes par tissu sont nécessaires à la réalisation de cette expérience, qui est répétée de 5 à 7 fois sur chacun des groupes. L'infection au *C. albicans* des groupes concernés a été discutée précédemment et correspond au modèle établi de la COP sur les souris CD4C/HIV^{MutA} (de Repentigny, Aumont et al. 2002).

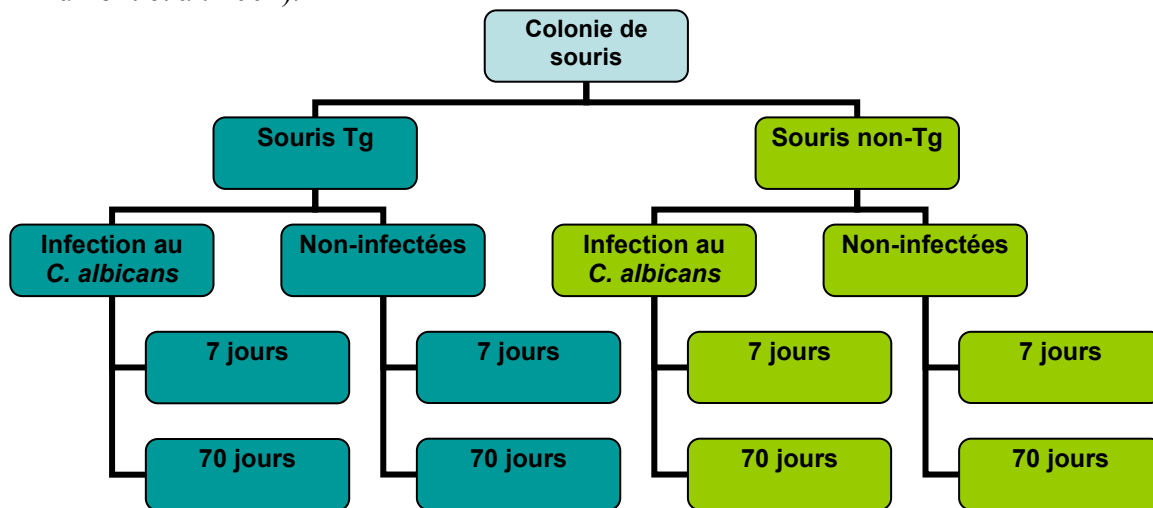


Figure 12 – Les huit groupes requis pour la quantification des macrophages.

Les macrophages sont identifiés à l'aide de deux combinaisons de quatre marqueurs exprimés au niveau de la surface cellulaire : CD45⁺, I-A^{k+}, CD11b⁺, F4/80⁺ ou CD45⁺, CD11c⁻, CD11b⁺, F4/80⁺. Les cellules contenues dans les échantillons sont au départ sélectionnées pour la présence du marqueur CD45⁺ à leur surface, ce qui permet ensuite la détection des cellules CD45⁺ exprimant les marqueurs CD11b et I-A^k ou l'absence du marqueur CD11c. Parmi les populations cellulaires CD45⁺, I-A^{k+}, CD11b⁺ ou CD45⁺, CD11c⁻, CD11b⁺, une sélection positive du marqueur F4/80 permet d'établir que ces cellules sont des macrophages (Fig. 13). La quantification de ces macrophages est en fait une mesure du pourcentage des macrophages dans la population totale de cellules CD45⁺. Ainsi, il est possible de déterminer s'il y a une variation des populations macrophagiques en fonction de la présence ou l'absence du transgène ou de l'infection au *Candida*.

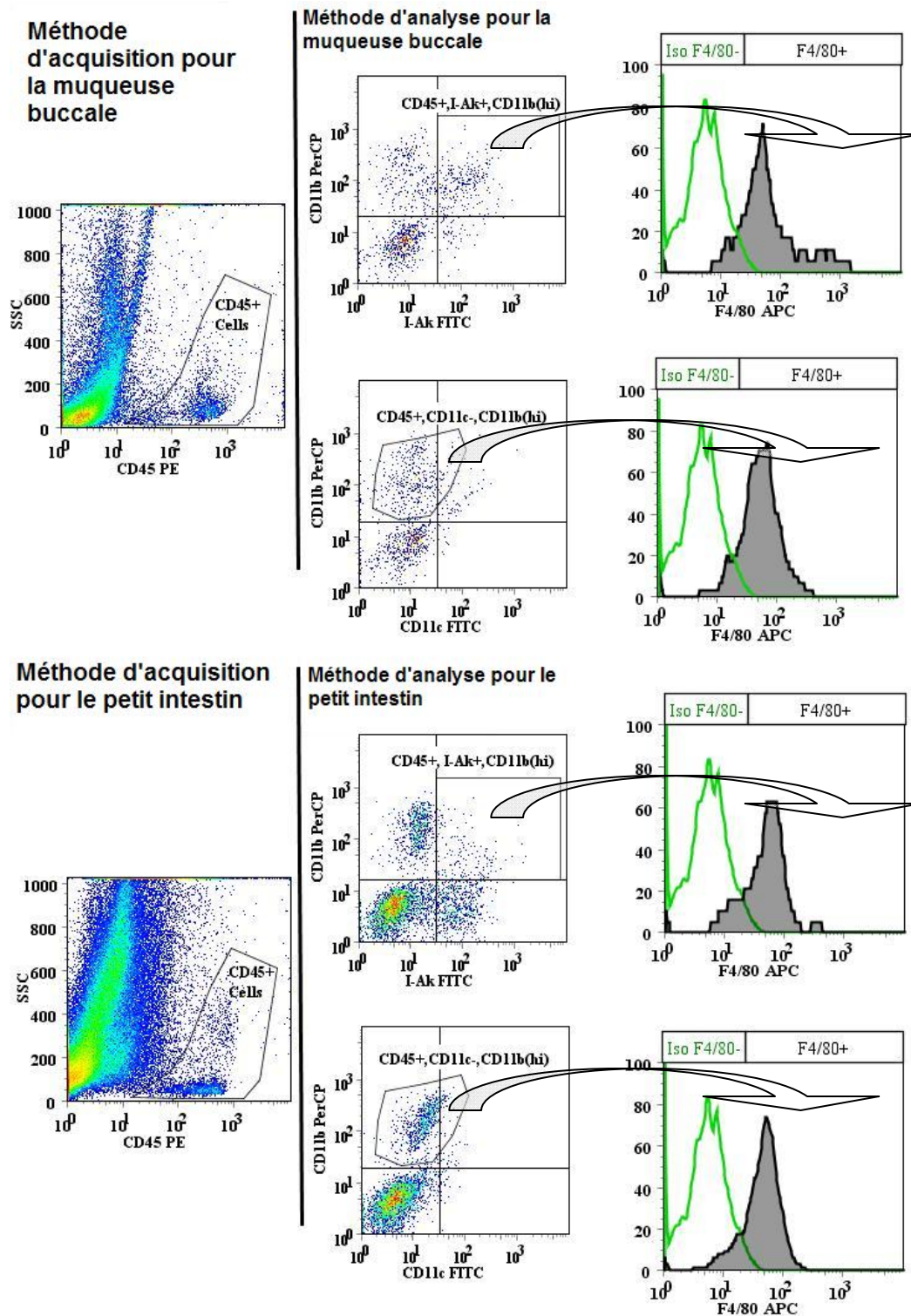


Figure 13 – Méthode d'analyse des macrophages par FACS sur le logiciel FlowJo. Les croix séparant les graphiques en quadrants indiquent le seuil de positivité des marqueurs, tel que déterminé par les contrôles isotypiques.

Sept jours après l'infection au *C. albicans*, il n'y a aucune différence significative de la proportion de macrophages dans la muqueuse buccale des souris appartenant aux différents groupes expérimentaux (Fig. 14). Le transgène et l'infection au *C. albicans* ne modifient pas significativement la proportion de macrophages par rapport aux souris non-Tg et non-infectées ($p > 0,05$). Par contre, chez les souris âgées, Tg et non-Tg, l'infection au *C. albicans* réduit de manière significative ($p < 0,05$) le pourcentage de macrophages observé dans la muqueuse buccale (Fig. 14). De plus, la charge buccale de *C. albicans* est statistiquement plus élevée chez les souris Tg infectées que chez les souris non-Tg infectées ($p > 0,05$).

Une analyse de variance démontre que, pour un même tissu, il n'y a aucune différence significative ($p > 0,05$) entre les résultats obtenus à l'aide des deux combinaisons d'anticorps. Cependant, un phénomène intéressant est observé parmi les résultats de quantification des macrophages obtenus par la combinaison d'anticorps CD45, I-A^k, CD11b et F4/80. En effet, les résultats obtenus à l'aide de cette combinaison chez les souris jeunes permettent d'observer un effet significatif ($p < 0,05$) du transgène réduisant la proportion de macrophages dans la muqueuse buccale. L'expression du transgène diminuerait donc la proportion de macrophages. Il est toutefois impossible de tirer la même conclusion lorsqu'on observe les résultats obtenus par la combinaison d'anticorps CD45, CD11c, CD11b et F4/80, où l'effet du transgène est non significatif ($p > 0,05$). De plus, lorsque que les données des deux combinaisons sont mises en commun, l'effet du transgène demeure non significatif ($p > 0,05$). Ainsi, il est impossible d'affirmer avec certitude que le transgène seul réduit la proportion de macrophages dans la muqueuse buccale chez les souris jeunes.

L'âge des souris, la présence ou l'absence du transgène ainsi que l'infection au *C. albicans* n'influencent pas de façon significative le pourcentage de macrophages dans le petit intestin ($p > 0,05$). Le pourcentage des macrophages par rapport aux cellules CD45⁺ demeure constant. La réduction des macrophages chez les souris âgées infectées au *C. albicans* semble donc se limiter à la muqueuse buccale.

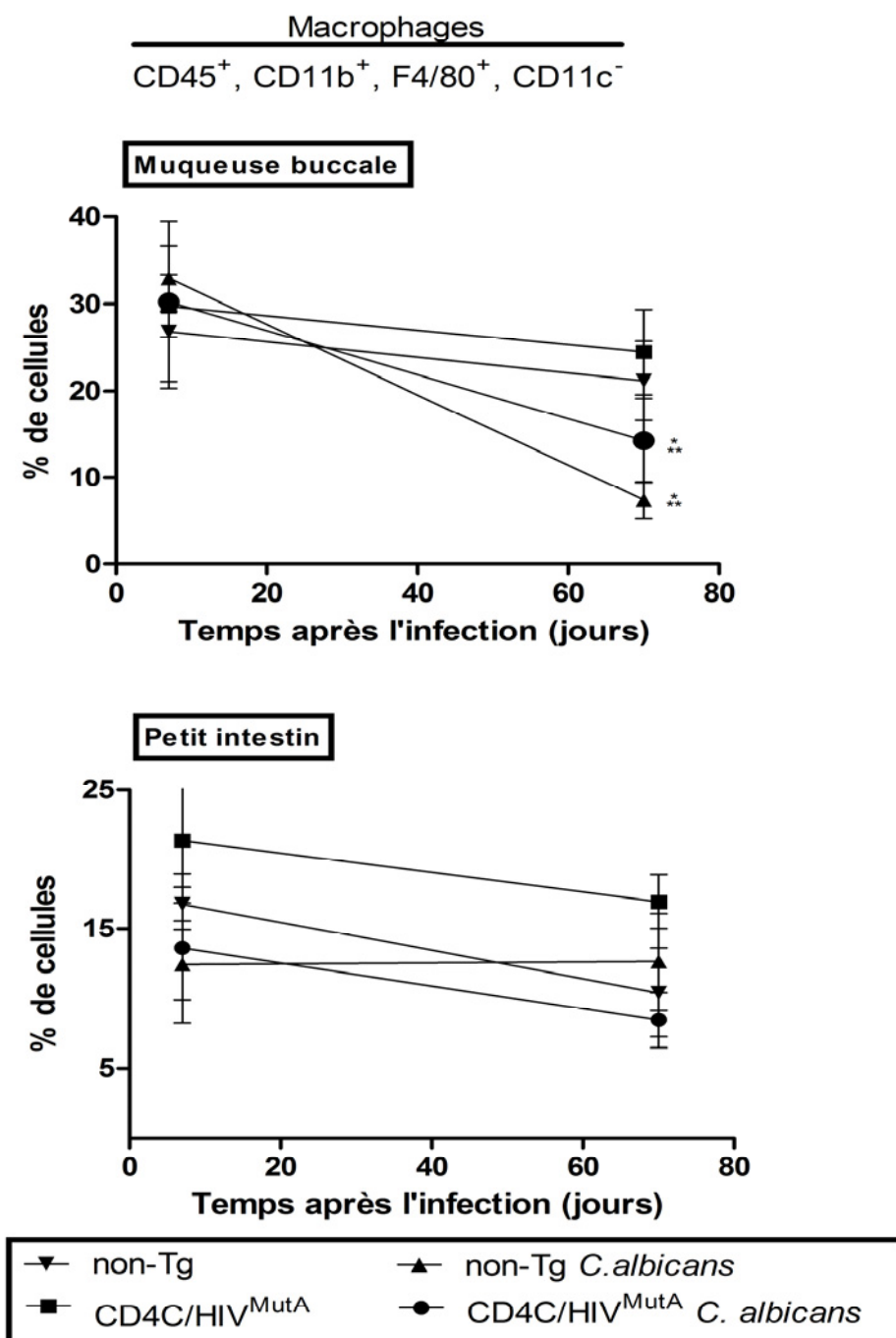


Figure 14 – Diminution du pourcentage de macrophages présents dans la muqueuse buccale chez les souris âgées infectées au *C. albicans*. Pourcentage de macrophages \pm écart type retrouvé dans la muqueuse buccale et le petit intestin chez les souris Tg et non-Tg, infectées ou non-infectées par *C. albicans*. Détection effectuée à l'aide de la combinaison d'anticorps CD45, CD11b, F4/80 et CD11c. * Différence significative entre les souris Tg et non-Tg. ** Différence significative à 70j entre les souris infectées et non-infectées.

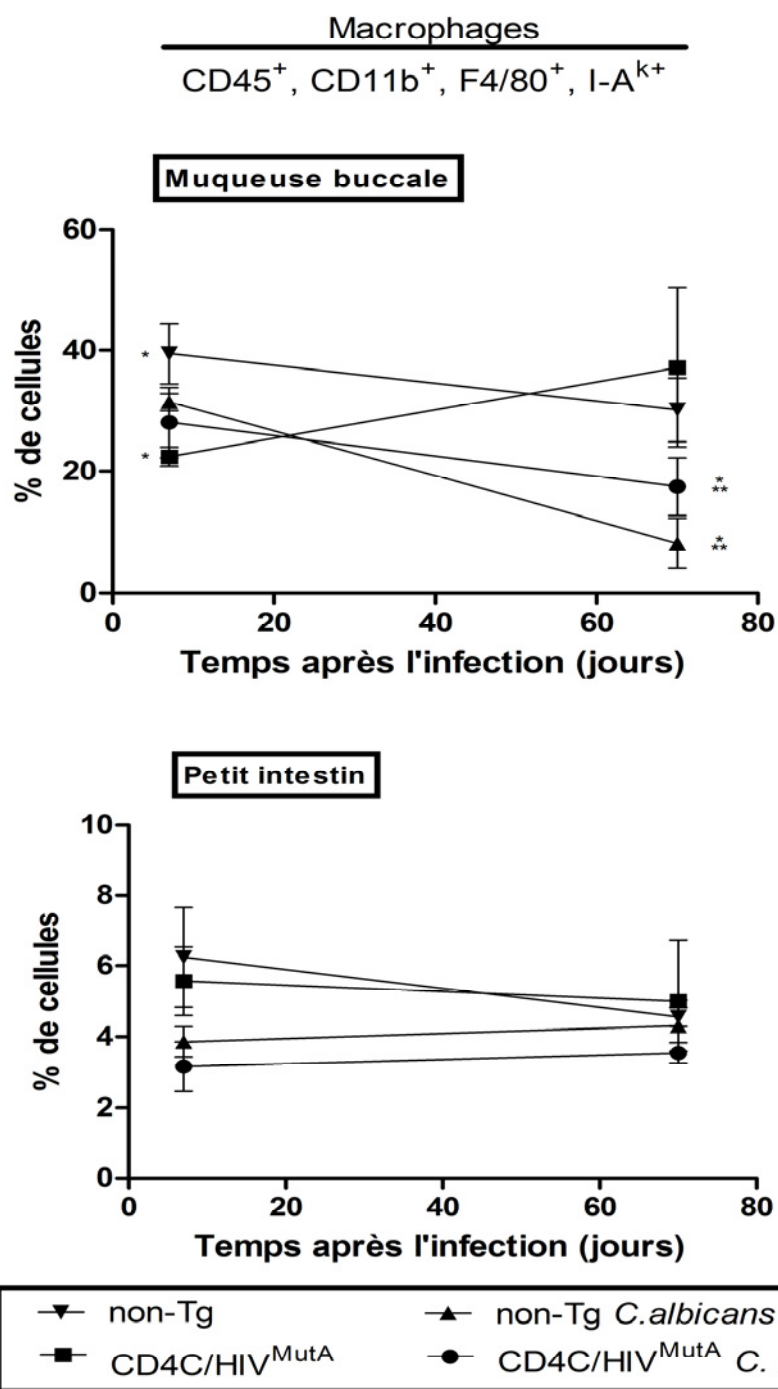


Figure 15 – Diminution du pourcentage de macrophages présents dans la muqueuse buccale chez les souris âgées infectées au *C. albicans* et chez les souris Tg. Pourcentage de macrophages ± écart type retrouvé dans la muqueuse buccale et le petit intestin chez les souris Tg et non-Tg, infectées ou non-infectées par *C. albicans*. Détection effectuée à l'aide de la combinaison d'anticorps CD45, CD11b, F4/80 et I-A^k. * Différence significative entre les souris Tg et non-Tg. ** Différence significative à 70j entre les souris infectées et non-infectées.

Production de peroxyde par les macrophages péritonéaux

L'étude de la production de H_2O_2 requiert une suspension cellulaire dont la densité est de 2×10^6 cellules/ml. La faible quantité de macrophages dans la muqueuse buccale ou le petit intestin (de 2 à 5% des cellules totales) empêche une mesure directe sur les macrophages provenant de ces tissus et nécessite l'utilisation d'une autre source permettant une récolte plus avantageuse. L'exsudat péritonéal non-illicite est la source de macrophages choisie pour cette expérience, car il contient en moyenne 50% de macrophages. Puisque ces macrophages proviennent d'un animal vivant, ils sont susceptibles d'offrir des résultats *ex vivo* plus précis que les macrophages dérivés de lignées cellulaires.

Quatre groupes sont nécessaires pour cette expérience, soit des souris jeunes (49 jours \pm 14 jours) ou vieilles (112 jours \pm 14 jours), transgéniques ou non-transgéniques. Il n'est pas utile d'avoir des groupes infectés au *C. albicans* car, dans le modèle de COP, les macrophages péritonéaux n'entrent pas en contact avec le champignon. De plus, les macrophages péritonéaux sont mis en présence de *C. albicans* directement dans les puits d'une microplaque, et non chez l'animal.

Les macrophages péritonéaux des souris jeunes et vieilles augmentent de façon significative ($p < 0,05$) leur production de H_2O_2 lorsqu'ils sont stimulés au PMA ou à l'aide de *C. albicans* (Fig. 16). De plus, les macrophages péritonéaux provenant des souris âgées ont une production supérieure de peroxyde comparativement aux macrophages des souris jeunes ($p < 0,05$). Cependant, les macrophages issus des groupes de souris Tg produisent significativement moins de H_2O_2 que leurs équivalents non-Tg, ce qui indique que l'expression du transgène chez les macrophages des souris Tg réduit la production de H_2O_2 (Fig. 16).

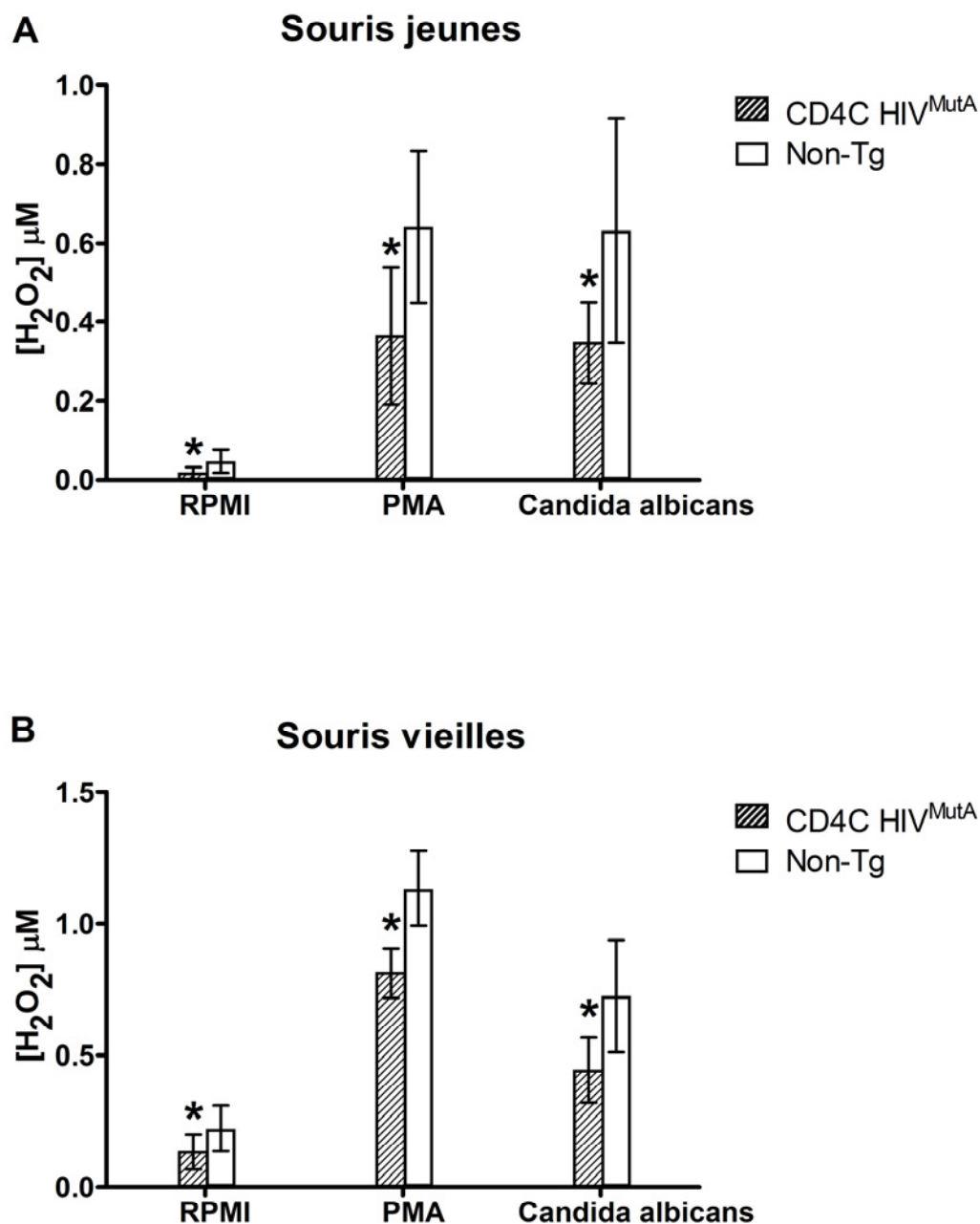


Figure 16 – Baisse significative de production de H₂O₂ par les macrophages des souris Tg jeunes et vieilles. Moyenne de production de H₂O₂ ± l'écart type par les macrophages de souris Tg et non-Tg, jeunes ou vieilles, en présence de *C. albicans* ou de PMA. * Différence significative ($p < 0,05$) entre les souris Tg et les non-Tg.

Production de cytokines pro-inflammatoires par les macrophages péritonéaux

L'étude de la production des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages péritonéaux requiert la création de groupes de souris identiques à ceux utilisés lors de la mesure de la production de H₂O₂. Les groupes infectés au *C. albicans* sont encore une fois exclus. L'incubation durant 48 heures permet l'accumulation des cytokines dans le surnageant, ce qui facilite leur détection. La figure 17 représente la moyenne \pm l'écart type, calculée à partir de 5 à 7 observations individuelles, de l'expression de chacune des cytokines.

Les macrophages péritonéaux provenant des souris Tg produisent des concentrations significativement supérieures ($p < 0,001$) d'IL-6 et de MCP-1 que les macrophages des souris non-Tg. Ce phénomène, observé lors de l'incubation *in vitro* en présence et en absence de *C. albicans*, suggère que les macrophages exprimant le transgène sont constitutivement activés. De plus, les macrophages de tous les groupes étudiés ont en commun l'augmentation significative ($p < 0,05$) de la production de TNF- α lorsqu'ils sont incubés en présence de *C. albicans*. Par ailleurs, les macrophages recueillis chez les souris âgées ont une capacité réduite de production des cytokines IL-6, MCP-1 et IFN- γ ($p < 0,001$). L'expression du transgène ou de la présence de *C. albicans* dans le milieu de culture n'influencent pas ce phénotype.

Finalement, les macrophages des groupes étudiés ne manifestent pas de différences significatives quant à la production des cytokines IL-10 et IL-12p70 ($p > 0,05$).

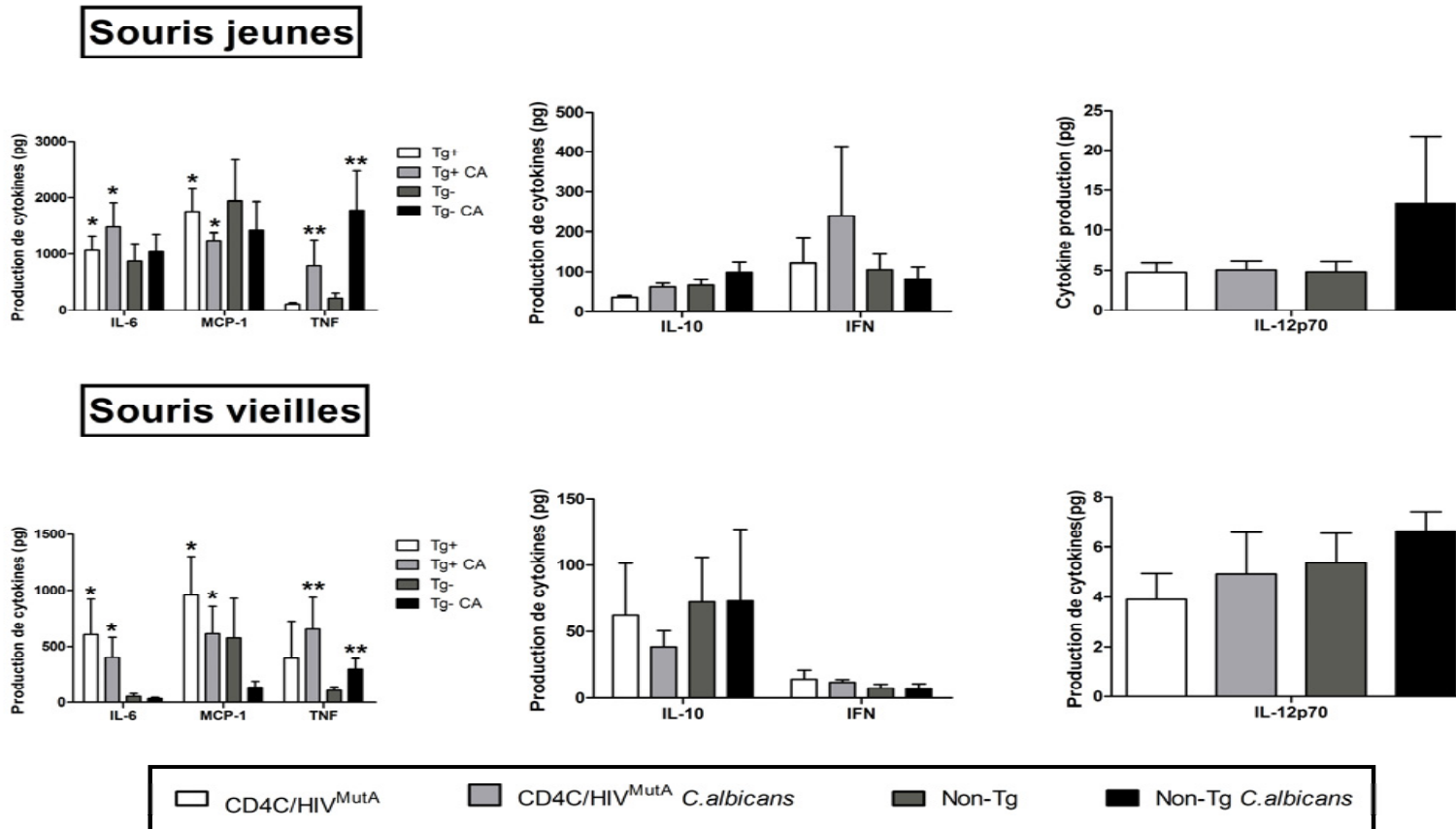


Figure 17 –Augmentation de la production macrophagique de TNF- α en présence de *C. albicans* et production d’une quantité supérieure d’IL-6 et de MCP-1 par les macrophages des souris Tg. Moyenne et écart type de la production de cytokines inflammatoires par les macrophages péritonéaux de souris Tg et non-Tg, infectée ou non-infectées au *C. albicans*. Il y a une différence significative ($p < 0,05$) entre les macrophages des souris Tg et non-Tg (*) ainsi qu’entre les macrophages incubés avec ou sans *C. albicans* (**).

CHAPITRE 6 : DISCUSSION

Les souris transgéniques exprimant les gènes *nef*, *rev* et *env* du VIH-1 présentent une maladie apparentée au SIDA causant la déplétion des lymphocytes T CD4+, l'atrophie et la fibrose des organes lymphoïdes et entraînant une mort prématurée. Les effets du transgène sont donc similaires aux atteintes pathologiques observées chez les patients infectés au VIH-1. Par ailleurs, l'expression du transgène chez les cellules dendritiques, les lymphocytes CD4+ et les macrophages, des populations normalement ciblées par le VIH-1, permet l'apparition d'une COP lorsque les souris sont infectées oralement au *C. albicans* (de Repentigny, Aumont et al. 2002). Cependant, même si *C. albicans* parvient à coloniser et à infecter les muqueuses orales, œsophagienne et gastrique de ces souris Tg, il en résulte très rarement une dissémination aux organes profonds, ce qui signifie que certaines des fonctions de l'immunité des muqueuses demeurent intactes. Il est déjà établi que la déplétion des lymphocytes T CD4+ ainsi que la polarisation de ces cellules vers une réponse non-protectrice Th2 sont les principaux déterminants de la COP chez la souris CD4C/HIV^{MutA} (Lewandowski, Marquis et al. 2006). La déplétion des cellules dendritiques, leur phénotype immature, la faible expression du CMH-II en surface et leur capacité réduite de production d'IL-12 contribuent aussi au développement de la COP (Lewandowski, Marquis et al. 2006). La déplétion des cellules T CD8+ chez les souris CD4C/HIV^{MutG} (CD8^{-/-}) cause une augmentation de la charge buccale de *C. albicans*, indiquant que les cellules T CD8+ contribuent à la défense de l'hôte contre *C. albicans* dans le contexte de l'expression du gène *nef* du VIH-1 (Marquis, Lewandowski et al. 2006). La poussée oxydative ainsi que la quantité de PMNs sont augmentées chez les souris transgéniques CD4C/HIV^{MutA}, tandis que la phagocytose et la fongicidie contre *C. albicans* sont très peu affectées (Marquis, Lewandowski et al. 2006). La déplétion des PMNs chez ces souris CD4C/HIV^{MutA} n'augmente pas la charge buccale de *C. albicans*, indiquant ainsi que les PMNs ne sont pas essentiels à la réponse immunitaire contre le champignon (Marquis, Lewandowski et al. 2006). L'étude quantitative et fonctionnelle des macrophages est donc pertinente, afin de

découvrir les perturbations potentiellement engendrées par l'expression du transgène chez ces cellules.

Nous avons tout d'abord vérifié le profil d'infection buccale aigüe et chronique au *C. albicans* chez la souris transgénique exprimant les gènes nef, rev et env du VIH-1. Les profils des charges buccales de *C. albicans* obtenus chez les souris Tg et non-Tg (Fig. 10 et 11) correspondent bien aux résultats déjà publiés, démontrant ainsi la reproductivité de ce phénotype de candidose (de Repentigny, Lewandowski et al. 2004).

Certaines perturbations des macrophages lors d'une infection de ces cellules par le VIH-1 ou par l'ajout dans le milieu de la protéine Nef ont déjà été étudiées. Ainsi, Nef induit des perturbations dans de nombreuses voies de signalisation des macrophages, notamment les voies du calcium, de l'apoptose, MAPK, STAT1, STAT3, JNK, ERK1/2, la kinase I κ B et IRF-3 (Federico, Percario et al. 2001; Mangino, Percario et al. 2007; Brown, Kohler et al. 2008). Nef augmente aussi la transcription de MIP1- α , MIP- β , IL-1 β , IL-6 et TNF- α (Olivetta, Percario et al. 2003; Mangino, Percario et al. 2007). Cependant, certaines voies de signalisation des macrophages demeurent relativement intactes : il s'agit de la voie de signalisation de la prolifération cellulaire et des voies de signalisation des TLR (Brown, Kohler et al. 2008). L'infection des macrophages par le VIH-1 semble même favoriser l'induction d'une réponse par la reconnaissance d'un agoniste des TLR (Brown, Kohler et al. 2008). Les effets du VIH-1 sur la phagocytose et les fonctions fongicides des macrophages ne font toutefois pas l'unanimité. Des études énoncent que les monocytes ainsi que des macrophages dérivés de monocytes provenant du sang de patients infectés par le VIH-1 conservent leurs propriétés fongicides envers *C. albicans* et leur capacité à phagocyter le champignon (Nielsen, Kharazmi et al. 1986; Nottet, de Graaf et al. 1993). D'autres études indiquent plutôt une réduction de la phagocytose et de la fongicidie des macrophages face à *C. albicans* (Crowe, Vardaxis et al. 1994; Crowe 1995). L'absence de consensus envers les effets de l'infection par le VIH-1 sur la phagocytose des macrophages est d'ailleurs observée chez d'autres

pathogènes. Lors d'une infection au VIH, la phagocytose des macrophages serait réduite envers *Toxoplasma*, tandis qu'elle demeurerait inchangée pour *S. aureus* et *E. coli* (Nottet, de Graaf et al. 1993; Biggs, Hewish et al. 1995).

L'étude quantitative des macrophages par cytométrie en flux permet de déterminer si l'infection au VIH-1 occasionne des changements au niveau du pourcentage des macrophages présents dans la muqueuse buccale et le petit intestin. Les résultats obtenus sur les macrophages provenant des muqueuses buccales de souris jeunes ou vieilles indiquent que le pourcentage de ceux-ci ne varie pas même s'ils expriment une partie du génome du VIH-1 (Fig. 14-15). Ceci concorde avec les études indiquant que les macrophages ne sont pas détruits par le VIH-1, mais font plutôt office de réservoirs à long terme pour le virus (Vazquez, Greenwell-Wild et al. 2005). En effet, la protéine nef du VIH-1 prévient l'apoptose des macrophages suite à l'infection, conférant à ces cellules une longévité accrue (Olivetta and Federico 2006). De plus, lorsque l'ADN viral n'est plus détecté dans le sang à la suite de l'application de la thérapie HAART, la charge virale retrouvée chez les macrophages infectés demeure élevée, confirmant ainsi le rôle de réservoir des macrophages (Garbuglia, Zaccarelli et al. 2001). Par ailleurs, chez les macrophages alvéolaires, les variations de l'expression du CMH-II (HLA-DR) sont causées par l'infection au VIH-1, mais que le virus ne modifie pas les proportions relatives des populations phénotypiquement distinctes de macrophages (Lipman, Johnson et al. 1995). L'infection des macrophages par le VIH-1 ne semble pas affecter quantitativement les populations de macrophages. Il convient toutefois de mentionner que, si le pourcentage des macrophages de la muqueuse buccale est comparable chez les souris Tg et non-Tg, leur nombre absolu est diminué chez les souris Tg. En effet, une étude démontre la diminution du nombre de monocytes, les précurseurs des macrophages, en parallèle avec la diminution des lymphocytes T CD4+, suite à l'infection au VIH-1 chez l'humain (Lucey, Hensley et al. 1991). L'analyse des données brutes recueillies par cytométrie en flux démontre d'ailleurs qu'il y a moins de cellules marquées par CD45 dans les échantillons de souris Tg que dans les échantillons de souris non-Tg (données non montrées).

Le pourcentage des macrophages chez les souris Tg et non-Tg âgées infectées au *C. albicans* est moindre que chez les souris âgées non-infectées (Fig. 14-15). Il est possible que la réduction du pourcentage des macrophages résulte d'un recrutement accru d'autres populations cellulaires. La présence de *C. albicans* au niveau de la muqueuse buccale provoque le recrutement de plusieurs populations au site d'infection, notamment les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, les macrophages et les PMNs. Toutes ces populations expriment le marqueur CD45 utilisé lors de la quantification des macrophages. Sachant que le pourcentage des macrophages est calculé sur l'ensemble des populations CD45⁺, il est possible que le pourcentage de macrophages diminue parce que les cellules des autres populations CD45⁺ recrutées lors de l'infection sont plus nombreuses que les macrophages. Par ailleurs, il est possible que la méthode utilisée pour l'analyse quantitative ne parvienne pas à détecter tous les macrophages présents chez les souris âgées. En effet, une étude de Murciano, Yanez et al. indique que suite à l'injection de conidies tuées de *C. albicans* dans la cavité péritonéale, les souris âgées recrutent une quantité supérieure de cellules que les souris jeunes (Murciano, Yanez et al. 2008). Parmi l'ensemble des cellules recrutées, on retrouve une population cellulaire significative F4/80⁻ et CHM-II⁺. Ces auteurs suggèrent qu'il s'agit de macrophages ayant perdu certaines molécules membranaires, dont F4/80 (Murciano, Yanez et al. 2008). Puisque, en présence de *C. albicans*, les souris âgées recrutent au niveau de la cavité péritonéale plus de cellules que les souris jeunes et qu'une portion considérable de ces cellules (43.3%) sont possiblement des macrophages n'exprimant plus la molécule F4/80 à leur surface, il est possible que cela influence le pourcentage de macrophages détecté, car des anticorps anti-F4/80 sont utilisés dans la détection des macrophages en cytométrie en flux (Murciano, Yanez et al. 2008). Le même phénomène pourrait se produire au niveau de la cavité buccale.

Il est surprenant d'observer une réduction du pourcentage des macrophages chez la souris âgée non-Tg, car les décomptes de *C. albicans* diminuent très fortement suite à la primo-infection (Fig. 14-15). Cependant, le champignon ne disparaît jamais

complètement, car de très faibles décomptes de *C. albicans* demeurent présents durant les semaines ultérieures (Fig. 15). Cela laisse penser que la faible présence de *C. albicans* au niveau de la muqueuse buccale est suffisante chez la souris non-Tg âgée pour induire le recrutement cellulaire provoquant le phénomène de réduction du pourcentage des macrophages.

Aucun consensus n'est présentement établi sur les effets d'une infection des macrophages par le VIH-1 sur leur fongicidie. Il demeure donc probable qu'au moins un des mécanismes permettant l'élimination des pathogènes fongiques par les macrophages soit affecté par l'expression du transgène. Chez *C. albicans*, les principaux mécanismes responsables de la fongicidie sont ceux associés à la poussée oxydative, soit la production de NO et de H₂O₂ (Vazquez-Torres and Balish 1997). La production d'H₂O₂ par les macrophages des souris Tg et non-Tg est augmentée de façon significative lorsqu'ils sont incubés en présence de *C. albicans* vivant ou de PMA et les macrophages des souris âgées ont une production supérieure de H₂O₂ par rapport aux souris jeunes Tg ou non-Tg (Fig. 16). Cependant, les macrophages provenant de groupes de souris Tg produisent toujours moins de H₂O₂ que leurs contreparties non-Tg (Fig. 16). La baisse de production de H₂O₂ chez les macrophages exprimant le transgène concorde avec une étude démontrant que Nef réduit indirectement, par la sécrétion de facteurs solubles tel l'IL-10, l'activité de la NADPH oxidase, une enzyme clé dans la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), ce qui résulte en l'affaiblissement de la poussée oxydative (Olivetta, Pietraforte et al. 2005). Sachant que le PMA augmente la phosphorylation de la PKC (*Protein Kinase C*) impliquée dans la voie d'activation déclenchant la production de H₂O₂ et que la production de H₂O₂ par les macrophages exprimant le transgène est réduite suite à la stimulation par le PMA, il est probable que Nef perturbe la cascade d'activation en aval de la PKC (Humphries and Yoshino 2008). La capacité des macrophages provenant des groupes de souris âgées à produire une quantité supérieure de H₂O₂ est aussi observée chez les macrophages alvéolaires de rats âgés, qui produisent des quantités supérieures de ROS et de NO comparativement aux rats jeunes (Tasat, Mancuso et al. 2003). Une étude récente

indique que *C. albicans* aurait la capacité de réduire la production de ROS *in vitro* (Wellington, Dolan et al. 2009), un phénomène qui n'est pas observé à la figure 16. La méthode de Wellington pour la quantification des ROS mesure principalement l'anion superoxyde et il est donc possible que la production de ROS totale soit diminuée, mais que la production de H₂O₂ ne soit pas affectée. De plus, les macrophages utilisés lors de l'étude de la production de peroxyde sont stimulés préalablement avec de l'IFN- γ , ce qui induit le phénotype M1 chez les macrophages *in vitro* (Chiang, Chen et al. 2008). Ainsi, en présence de *C. albicans*, les macrophages étudiés lors de la production de H₂O₂ sont complètement activés, ce qui n'est pas le cas des macrophages utilisés dans les travaux de Wellington.

Même si la pré-activation des macrophages par l'IFN- γ est bien documentée (Mantovani, Sica et al. 2004; Schroder, Sweet et al. 2006), il importe de vérifier que les différences de production de H₂O₂ entre les macrophages des souris Tg et non-Tg ne proviennent pas d'une réponse altérée face à cette cytokine. En présence d'agonistes des TLRs, l'IFN- γ active aussi la production de NO, un autre mécanisme fongicide (Gao, Morrison et al. 1997; Schroder, Sweet et al. 2006). Puisque la production de NO chez les macrophages provenant de souris Tg stimulés par de l'IFN- γ et mis en présence de *C. albicans* demeure inchangée par rapport aux souris non-Tg (Goupil, Belanger Trudelle et al. 2009), il semble que les macrophages exprimant le transgène conservent la capacité de répondre à une stimulation par l'IFN- γ . Ainsi, la réduction de la production de H₂O₂ n'est vraisemblablement pas causée par une perturbation de la réponse des macrophages envers l'IFN- γ .

Toutefois, puisqu'une étude démontre que les macrophages infectés par le VIH-1 parviennent à tuer les pathogènes opsonisés *C. albicans* et *E. coli* aussi efficacement que les macrophages non-infectés (Nottet, de Graaf et al. 1993), il est impossible d'affirmer que la baisse de la production de H₂O₂ par les macrophages provenant des souris Tg, observée *in vitro*, est biologiquement significative *in vivo*.

Les cytokines produites par les macrophages sont essentielles dans le cadre d'une réponse immunitaire, car elles permettent l'activation et le recrutement d'autres cellules du système immunitaire, tout en orientant la réponse vers Th1 ou Th2. En présence ou en absence de *C. albicans* tué, les macrophages provenant des souris Tg ont une production supérieure d'IL-6 par rapport aux macrophages des souris non-Tg (Fig. 17). La production d'IL-6 est l'une des caractéristiques du phénotype M1 des macrophages, signifiant que les macrophages exprimant le transgène ont un phénotype activé (Gordon 2003). Par ailleurs, une production supérieure d'IL-6 est aussi une caractéristique de l'infection au VIH-1, car le gène codant pour l'IL-6 est sous le contrôle de NF- κ B, un facteur de transcription activé par Nef, ce qui crée un phénotype d'activation chronique (Olivetta, Percario et al. 2003). La molécule MCP-1 est aussi produite en concentration supérieure par les macrophages exprimant le transgène (Fig. 17). Cette observation concorde avec la littérature, qui indique que l'infection des macrophages par le VIH-1 provoque l'augmentation de la production de MCP-1 (Wetzel, Steele et al. 2002). La production supérieure de MCP-1 est causée par la protéine virale gp120, codée par le gène env, qui est exprimé chez les macrophages des souris Tg (Wetzel, Steele et al. 2002). De plus, MCP-1 est une molécule permettant le recrutement par chimiotactisme des lymphocytes T, des monocytes et des cellules dendritiques (Carr, Roth et al. 1994; Xu, Warren et al. 1996). La surexpression de MCP-1 causée par le VIH-1 est donc avantageuse, car elle permet le recrutement au site d'infection et de réplication virale de populations cellulaires pouvant être infectées efficacement par le virus (Wetzel, Steele et al. 2002).

Chez les macrophages des souris Tg et non-Tg, la production de TNF- α est augmentée en présence de *C. albicans* (Fig. 17). *C. albicans* possède des ligands pour les récepteurs TLR2, TLR4 et dectine-1, qui sont tous présents chez les macrophages. Ces récepteurs peuvent agir en synergie afin d'augmenter la réponse immunitaire du macrophage face au *C. albicans* en relâchant des cytokines pro-inflammatoires, dont TNF- α , qui est sous le contrôle du facteur de transcription NF- κ B (Ferwerda, Meyer-Wentrup et al. 2008). L'expression élevée de TNF- α chez les

macrophages activés par la présence de *C. albicans* est caractéristique du phénotype M1 étroitement associé à une réponse Th1 protectrice face au champignon. Il s'agit donc d'une réponse normale et attendue de la part des macrophages (Ashman and Papadimitriou 1995; Gordon 2003). Par ailleurs, les voies de signalisation en amont de TLR2 et de dectine-1, ainsi que de TLR4 ne sont pas affectées lors de l'infection au VIH-1, ce qui permet une production normale de TNF- α chez la souris transgénique (Brown, Herre et al. 2003; Brown, Kohler et al. 2008). Des études sur des souris TNF-/- indiquent que la production de TNF- α est d'une importance modérée lors de la candidose oro-pharyngée, car l'absence de TNF- α modifie uniquement la sévérité de l'infection à *C. albicans*, sans en modifier la durée (Farah, Hu et al. 2006). Toutefois, la production de TNF- α est essentielle pour la survie à une candidose systémique (Marino, Dunn et al. 1997; Farah, Hu et al. 2006).

Les macrophages extraits des souris âgées Tg ou non-Tg produisent moins d'IL-6, de MCP-1 et d'IFN- γ par rapport aux macrophages des souris jeunes. La diminution induite par l'âge des capacités des cellules immunitaires tels les macrophages se nomme l'immunosénescence (Plackett, Boehmer et al. 2004). Les macrophages âgés sécrètent moins de cytokines pro-inflammatoires lors d'une activation par les TLRs, car TLR2, TLR4 et les MAP Kinases sont exprimés plus faiblement chez les cellules âgées, ce qui occasionne des dérèglements des voies de signalisation (Renshaw, Rockwell et al. 2002; Boehmer, Goral et al. 2004; Boehmer, Meehan et al. 2005). Ainsi, les macrophages murins âgés démontrent une diminution de la production d'IFN- γ et d'IL-6 lorsqu'ils sont mis en présence de levures et d'hyphes de *C. albicans* (Murciano, Villamon et al. 2006; Murciano, Yanez et al. 2008). Les études au sujet des effets de la sénescence sur la production de la molécule MCP-1 ont produit des résultats divergents. En effet, une étude rapporte que suite à une blessure causée par l'excision d'une partie de l'épiderme dorsal, la production de MCP-1 par les macrophages est augmentée chez la souris âgée, tandis qu'une autre étude démontre que la production de MCP-1 est diminuée chez les souris âgés suite à une brûlure (Swift, Burns et al. 2001; Shallo, Plackett et al. 2003). Cependant, 4 jours après la brûlure, la quantité de macrophages présents au niveau de la blessure était

identique chez les souris jeunes et vieilles (Swift, Burns et al. 2001). Ainsi, même si les macrophages des souris vieilles Tg et non-Tg ont une production réduite de MCP-1, il n'est pas assuré que cela ait un effet biologiquement significatif.

Il n'y a aucune différence dans la production des cytokines IL-10 et IL-12p70 par les macrophages des souris Tg et non-Tg (Fig. 17). Alors que des études indiquaient que l'infection au VIH-1 n'altérerait pas la production d'IL-10 par les monocytes sanguins ou les macrophages dérivés de monocytes (Chehimi, Ma et al. 1996; Dereuddre-Bosquet, Clayette et al. 1997; Bergamini, Bolacchi et al. 1998), d'autres études ont plutôt démontrés une augmentation de la production d'IL-10 lors d'une infection au VIH-1 (Akridge, Oyafuso et al. 1994; Borghi, Fantuzzi et al. 1995; Bergamini, Bolacchi et al. 1998). Effectivement, la protéine Tat du VIH-1 active PKC- δ et PKC- β II ce qui induit l'augmentation de la production d'IL-10 dans les monocytes humains, qui sont les précurseurs des macrophages (Bennasser and Bahraoui 2002; Leghmari, Bennasser et al. 2008). Bien qu'il semble y avoir un effet possible du VIH-1 sur la production de l'IL-10, cet effet ne peut être observé chez la souris transgénique CD4C/HIV^{MutA}, car le transgène permet exclusivement l'expression que de nef, rev et env. Il en va de même pour la production de l'IL-12. Chez les monocytes humains, la protéine Vpr possède la capacité de réduire la production d'IL-12 en favorisant l'inhibition de l'expression de l'ARN messenger et la sécrétion de la cytokine par l'augmentation de l'activité des récepteurs de glucocorticoïdes (Mirani, Elenkov et al. 2002). À l'instar de Tat, Vpr n'est pas exprimé chez la souris transgénique employée et il s'avère donc impossible d'en constater les effets.

Malgré une littérature abondante démontrant une polarisation de la production des cytokines de Th1 vers Th2 lors de l'infection au VIH-1 (Clerici and Shearer 1993; Barcellini, Rizzardi et al. 1994; Klein, Dobmeyer et al. 1997), cette polarisation semble absente chez les macrophages provenant des souris Tg, qui produisent plutôt des cytokines associées à la réponse Th1 (Fig. 17). Tel que mentionné plus haut, la production de certaines cytokines est modulée par les protéines accessoires produites par le VIH-1. Il est donc possible que certaines cytokines affectées lors d'une

infection au VIH-1 chez l'humain ne soient pas perturbées chez la souris CD4C/HIV^{MutA}, car les produits des gènes viraux nécessaires aux modifications de la production de ces cytokines n'y sont pas exprimés. Ceci pourrait expliquer pourquoi la salive de patients infectés par le VIH-1 présente un profil de cytokines correspondant à Th2 (Klein, Dobbmeyer et al. 1997; Leigh, Steele et al. 1998), tandis que les lymphocytes T CD4⁺ de la souris Tg CD4C/HIV^{MutA} produisent les cytokines IFN- γ , IL-2, TNF- α , IL-4 et IL-10, ce qui représente un mélange de cytokines Th1 et Th2 (Klein, Dobbmeyer et al. 1997; Lewandowski, Marquis et al. 2006). De plus, l'ensemble de la muqueuse buccale (comprenant des populations cellulaires autres qu'uniquement des macrophages) de la souris Tg CD4C/HIV^{MutA} produit plus d'IL-4 que les souris non-Tg (Lewandowski, Marquis et al. 2006). Il s'agit possiblement d'une des raisons pour lesquelles les souris CD4C/HIV^{WT} meurent plus vite que les CD4C/HIV^{MutA}, car elles expriment le génome du VIH-1 dans sa totalité, créant des perturbations plus prononcées au niveau des voies de signalisation et de production des cytokines. Si les macrophages exprimant le transgène sécrètent des cytokines de type Th1 *in vitro*, il n'est toutefois pas exclu qu'*in vivo*, les cytokines sécrétées par d'autres populations cellulaires soient de type Th2 et que cette production de cytokines opère un changement dans la polarisation globale vers Th2.

Finalement, nous avons démontré que l'expression du transgène cause des perturbations fonctionnelles chez les macrophages murins. En effet, Nef semble réduire la production de H₂O₂ des macrophages en réponse au PMA ou au *C. albicans*, tout en induisant une production supérieure d'IL-6. La production de la molécule MCP-1 semble augmentée par la présence de la protéine de l'enveloppe virale gp120. Cependant, ces observations ont été effectuées uniquement sur les macrophages *in vitro*, il est donc impossible de prédire la signification de ces perturbations *in vivo*. Par ailleurs, il serait intéressant de produire de nouvelles constructions transgéniques pouvant exprimer d'autres protéines virales, tel Vpr et Tat, afin de vérifier si les effets de ces protéines chez l'humain peuvent être reproduits chez la souris.

La COP étant la principale maladie opportuniste chez les patients atteints du VIH-1, son étude chez la souris transgénique permet d'en apprendre davantage sur les perturbations du système immunitaire causées par l'infection au VIH-1. Ainsi, les nouvelles connaissances apportées dans le cadre de cette étude permettent de déterminer l'impact des perturbations des macrophages sur l'immunité mucoale lors d'une infection au VIH-1. Puisque le modèle de COP chez la souris transgénique exprimant le génome du VIH-1 correspond bien aux effets observés chez les humains infectés par le virus (Hanna, Kay et al. 1998), la transposition chez l'humain des nouvelles connaissances obtenues à l'aide de ce modèle permettra éventuellement de réduire l'apparition de maladies opportunistes chez les sidéens, de développer des thérapies compensant les perturbations causées par le VIH-1 et de créer des méthodes de reconstitution du système immunitaire chez les patients atteints du VIH-1.

BIBLIOGRAPHIE

- Akridge, R. E., L. K. Oyafuso, et al. (1994). "IL-10 is induced during HIV-1 infection and is capable of decreasing viral replication in human macrophages." J Immunol **153**(12): 5782-9.
- Annunziato, F., L. Cosmi, et al. (2009). "Human Th17 cells: are they different from murine Th17 cells?" Eur J Immunol **39**(3): 637-40.
- Ansel, J., P. Perry, et al. (1990). "Cytokine modulation of keratinocyte cytokines." J Invest Dermatol **94**(6 Suppl): 101S-107S.
- Ashman, R. B., C. S. Farah, et al. (2004). "Innate versus adaptive immunity in *Candida albicans* infection." Immunol Cell Biol **82**(2): 196-204.
- Ashman, R. B. and J. M. Papadimitriou (1995). "Production and function of cytokines in natural and acquired immunity to *Candida albicans* infection." Microbiol Rev **59**(4): 646-72.
- Balish, E., H. Filutowicz, et al. (1990). "Correlates of cell-mediated immunity in *Candida albicans*-colonized gnotobiotic mice." Infect Immun **58**(1): 107-13.
- Balish, E., R. D. Wagner, et al. (1998). "Candidiasis in interferon-gamma knockout (IFN-gamma^{-/-}) mice." J Infect Dis **178**(2): 478-87.
- Banchereau, J. and R. M. Steinman (1998). "Dendritic cells and the control of immunity." Nature **392**(6673): 245-52.
- Barcellini, W., G. P. Rizzardì, et al. (1994). "TH1 and TH2 cytokine production by peripheral blood mononuclear cells from HIV-infected patients." AIDS **8**(6): 757-62.
- Bennasser, Y. and E. Bahraoui (2002). "HIV-1 Tat protein induces interleukin-10 in human peripheral blood monocytes: involvement of protein kinase C-β and -δ." FASEB J **16**(6): 546-54.
- Beno, D. W. and H. L. Mathews (1992). "Growth inhibition of *Candida albicans* by interleukin-2-activated splenocytes." Infect Immun **60**(3): 853-63.
- Beno, D. W., A. G. Stover, et al. (1995). "Growth inhibition of *Candida albicans* hyphae by CD8⁺ lymphocytes." J Immunol **154**(10): 5273-81.
- Bergamini, A., F. Bolacchi, et al. (1998). "HIV-1 does not alter in vitro and in vivo IL-10 production by human monocytes and macrophages." Clin Exp Immunol **112**(1): 105-11.
- Berger, C. L., J. G. Vasquez, et al. (2006). "Langerhans cells: mediators of immunity and tolerance." Int J Biochem Cell Biol **38**(10): 1632-6.

- Biggs, B. A., M. Hewish, et al. (1995). "HIV-1 infection of human macrophages impairs phagocytosis and killing of *Toxoplasma gondii*." J Immunol **154**(11): 6132-9.
- Blume, R. S., G. A. Padgett, et al. (1969). "Giant neutrophil granules in the Chediak-Higashi syndrome of man, mink, cattle and mice." Can J Comp Med **33**(4): 271-4.
- Boehmer, E. D., J. Goral, et al. (2004). "Age-dependent decrease in Toll-like receptor 4-mediated proinflammatory cytokine production and mitogen-activated protein kinase expression." J Leukoc Biol **75**(2): 342-9.
- Boehmer, E. D., M. J. Meehan, et al. (2005). "Aging negatively skews macrophage TLR2- and TLR4-mediated pro-inflammatory responses without affecting the IL-2-stimulated pathway." Mech Ageing Dev **126**(12): 1305-13.
- Bolduc, C., J. D. Waterfield, et al. (1990). "Tissue distribution and cytofluorometric analysis of oral mucosal T cells in the BALB/c mouse." Res Immunol **141**(6): 461-75.
- Borghi, P., L. Fantuzzi, et al. (1995). "Induction of interleukin-10 by human immunodeficiency virus type 1 and its gp120 protein in human monocytes/macrophages." J Virol **69**(2): 1284-7.
- Brown, G. D., J. Herre, et al. (2003). "Dectin-1 mediates the biological effects of beta-glucans." J Exp Med **197**(9): 1119-24.
- Brown, J. N., J. J. Kohler, et al. (2008). "HIV-1 activates macrophages independent of Toll-like receptors." PLoS ONE **3**(12): e3664.
- Calderone, R. A. (2002). Candida and candidiasis. Washington, D.C., ASM Press.
- Calderone, R. A. and W. A. Fonzi (2001). "Virulence factors of *Candida albicans*." Trends Microbiol **9**(7): 327-35.
- Cantorna, M. T. and E. Balish (1990). "Mucosal and systemic candidiasis in congenitally immunodeficient mice." Infect Immun **58**(4): 1093-100.
- Cantorna, M. T. and E. Balish (1991). "Role of CD4+ lymphocytes in resistance to mucosal candidiasis." Infect Immun **59**(7): 2447-55.
- Carr, M. W., S. J. Roth, et al. (1994). "Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(9): 3652-6.
- Chai, L. Y., M. G. Netea, et al. (2008). "Fungal strategies for overcoming host innate immune response." Med Mycol: 1-10.

- Challacombe, S. J. and J. R. Naglik (2006). "The effects of HIV infection on oral mucosal immunity." Adv Dent Res **19**(1): 29-35.
- Chattopadhyay, A., L. R. Gray, et al. (2004). "Salivary secretory leukocyte protease inhibitor and oral candidiasis in human immunodeficiency virus type 1-infected persons." Infect Immun **72**(4): 1956-63.
- Chehimi, J., X. Ma, et al. (1996). "Differential production of interleukin 10 during human immunodeficiency virus infection." AIDS Res Hum Retroviruses **12**(12): 1141-9.
- Chiang, C. S., F. H. Chen, et al. (2008). "Functional phenotype of macrophages depends on assay procedures." Int Immunol **20**(2): 215-22.
- Christin, L., D. R. Wysong, et al. (1997). "Mechanisms and target sites of damage in killing of *Candida albicans* hyphae by human polymorphonuclear neutrophils." J Infect Dis **176**(6): 1567-78.
- Clerici, M. and G. M. Shearer (1993). "A TH1-->TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection." Immunol Today **14**(3): 107-11.
- Colasante, A., S. Rosini, et al. (1992). "Distribution and phenotype of immune cells in normal human gingiva: active immune response versus unresponsiveness." J Oral Pathol Med **21**(1): 12-6.
- Conti, H. R., F. Shen, et al. (2009). "Th17 cells and IL-17 receptor signaling are essential for mucosal host defense against oral candidiasis." J Exp Med **206**(2): 299-311.
- Costin, J. M. (2007). "Cytopathic mechanisms of HIV-1." Virology **4**: 100.
- Crowe, S. M. (1995). "Role of macrophages in the pathogenesis of human immunodeficiency virus (HIV) infection." Aust N Z J Med **25**(6): 777-83.
- Crowe, S. M., N. J. Vardaxis, et al. (1994). "HIV infection of monocyte-derived macrophages in vitro reduces phagocytosis of *Candida albicans*." J Leukoc Biol **56**(3): 318-27.
- Cunningham, A. L., F. Carbone, et al. (2008). "Langerhans cells and viral immunity." Eur J Immunol **38**(9): 2377-85.
- Daniels, K. J., T. Srikantha, et al. (2006). "Opaque cells signal white cells to form biofilms in *Candida albicans*." EMBO J **25**(10): 2240-52.
- de Repentigny, L. (2004). "Animal models in the analysis of *Candida* host-pathogen interactions." Curr Opin Microbiol **7**(4): 324-9.

- de Repentigny, L., F. Aumont, et al. (2002). "Mucosal candidiasis in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1." J Infect Dis **185**(8): 1103-14.
- de Repentigny, L., D. Lewandowski, et al. (2004). "Immunopathogenesis of oropharyngeal candidiasis in human immunodeficiency virus infection." Clin Microbiol Rev **17**(4): 729-59, table of contents.
- Dereuddre-Bosquet, N., P. Clayette, et al. (1997). "Lack of interleukin 10 expression in monocyte-derived macrophages in response to in vitro infection by HIV type 1 isolates." AIDS Res Hum Retroviruses **13**(11): 961-6.
- Deslauriers, N., L. Cote, et al. (1997). "Oral carriage of *Candida albicans* in murine AIDS." Infect Immun **65**(2): 661-7.
- Doumas, S., A. Kolokotronis, et al. (2005). "Anti-inflammatory and antimicrobial roles of secretory leukocyte protease inhibitor." Infect Immun **73**(3): 1271-4.
- Farah, C. S., S. Elahi, et al. (2002). "Primary role for CD4(+) T lymphocytes in recovery from oropharyngeal candidiasis." Infect Immun **70**(2): 724-31.
- Farah, C. S., T. Gotjamanos, et al. (2002). "Cytokines in the oral mucosa of mice infected with *Candida albicans*." Oral Microbiol Immunol **17**(6): 375-8.
- Farah, C. S., S. Hong, et al. (2001). "Irradiation-induced oral candidiasis in an experimental murine model." Oral Microbiol Immunol **16**(6): 358-63.
- Farah, C. S., Y. Hu, et al. (2006). "Distinct roles for interleukin-12p40 and tumour necrosis factor in resistance to oral candidiasis defined by gene-targeting." Oral Microbiol Immunol **21**(4): 252-5.
- Federico, M., Z. Percario, et al. (2001). "HIV-1 Nef activates STAT1 in human monocytes/macrophages through the release of soluble factors." Blood **98**(9): 2752-61.
- Ferwerda, G., F. Meyer-Wentrup, et al. (2008). "Dectin-1 synergizes with TLR2 and TLR4 for cytokine production in human primary monocytes and macrophages." Cell Microbiol **10**(10): 2058-66.
- Fidel, P. L., Jr. (2002). "Immunity to *Candida*." Oral Dis **8 Suppl 2**: 69-75.
- Fidel, P. L., Jr., J. Cutright, et al. (2000). "Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis." Infect Immun **68**(2): 651-7.
- Forsman, A. and R. A. Weiss (2008). "Why is HIV a pathogen?" Trends Microbiol **16**(12): 555-60.

- Galask, R. P. (1988). "Vaginal colonization by bacteria and yeast." Am J Obstet Gynecol **158**(4): 993-5.
- Gao, J., D. C. Morrison, et al. (1997). "An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide." J Biol Chem **272**(2): 1226-30.
- Garbuglia, A. R., M. Zaccarelli, et al. (2001). "Dynamics of viral load in plasma and HIV DNA in lymphocytes during highly active antiretroviral therapy (HAART): high viral burden in macrophages after 1 year of treatment." J Chemother **13**(2): 188-94.
- Glick, M. and M. A. Siegel (1999). "Viral and fungal infections of the oral cavity in immunocompetent patients." Infect Dis Clin North Am **13**(4): 817-31, vi.
- Gorbach, S. L., L. Nahas, et al. (1967). "Studies of intestinal microflora. I. Effects of diet, age, and periodic sampling on numbers of fecal microorganisms in man." Gastroenterology **53**(6): 845-55.
- Gordon, S. (2003). "Alternative activation of macrophages." Nat Rev Immunol **3**(1): 23-35.
- Goupil, M., E. Belanger Trudelle, et al. (2009). "Macrophage-mediated responses to *Candida albicans* in transgenic mice expressing HIV-1." Infect Immun.
- Grone, A. (2002). "Keratinocytes and cytokines." Vet Immunol Immunopathol **88**(1-2): 1-12.
- Hamann, J., N. Koning, et al. (2007). "EMR1, the human homolog of F4/80, is an eosinophil-specific receptor." Eur J Immunol **37**(10): 2797-802.
- 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): 121-32.
- Hanna, Z., D. G. Kay, et al. (1998). "Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice." Cell **95**(2): 163-75.
- Hoyer, L. L., C. B. Green, et al. (2008). "Discovering the secrets of the *Candida albicans* agglutinin-like sequence (ALS) gene family--a sticky pursuit." Med Mycol **46**(1): 1-15.
- Huang, W., L. Na, et al. (2004). "Requirement of interleukin-17A for systemic anti-*Candida albicans* host defense in mice." J Infect Dis **190**(3): 624-31.

- Humphries, J. E. and T. P. Yoshino (2008). "Regulation of hydrogen peroxide release in circulating hemocytes of the planorbid snail *Biomphalaria glabrata*." Dev Comp Immunol **32**(5): 554-62.
- Ihalin, R., V. Loimaranta, et al. (2006). "Origin, structure, and biological activities of peroxidases in human saliva." Arch Biochem Biophys **445**(2): 261-8.
- Janeway, C. and P. Travers (2003). Immunobiology : the immune system in health and disease. London ; San Francisco; New York, Current Biology, Garland Pub.
- Jarvis, W. R. (1995). "Epidemiology of nosocomial fungal infections, with emphasis on *Candida* species." Clin Infect Dis **20**(6): 1526-30.
- Jones-Carson, J., A. Vazquez-Torres, et al. (2000). "Disparate requirement for T cells in resistance to mucosal and acute systemic candidiasis." Infect Immun **68**(4): 2363-5.
- Kamai, Y., M. Kubota, et al. (2001). "New model of oropharyngeal candidiasis in mice." Antimicrob Agents Chemother **45**(11): 3195-7.
- Kaplan, D. H., A. Kissenpfennig, et al. (2008). "Insights into Langerhans cell function from Langerhans cell ablation models." Eur J Immunol **38**(9): 2369-76.
- Kaplan, J., I. De Domenico, et al. (2008). "Chediak-Higashi syndrome." Curr Opin Hematol **15**(1): 22-9.
- Kavanagh, K. and S. Dowd (2004). "Histatins: antimicrobial peptides with therapeutic potential." J Pharm Pharmacol **56**(3): 285-9.
- Kennedy, A. D. and F. R. Deleo (2008). "Neutrophil apoptosis and the resolution of infection." Immunol Res.
- Klein, S. A., J. M. Dobbmeyer, et al. (1997). "Demonstration of the Th1 to Th2 cytokine shift during the course of HIV-1 infection using cytoplasmic cytokine detection on single cell level by flow cytometry." AIDS **11**(9): 1111-8.
- Kleinegger, C. L., D. C. Stoeckel, et al. (2001). "A comparison of salivary calprotectin levels in subjects with and without oral candidiasis." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **92**(1): 62-7.
- Klotman, P. E., J. Rappaport, et al. (1995). "Transgenic models of HIV-1." AIDS **9**(4): 313-24.
- Kobayashi, S. D., J. M. Voyich, et al. (2005). "Neutrophils in the innate immune response." Arch Immunol Ther Exp (Warsz) **53**(6): 505-17.

- Kourtis, A. P., D. J. Jamieson, et al. (2007). "Prevention of human immunodeficiency virus-1 transmission to the infant through breastfeeding: new developments." Am J Obstet Gynecol **197**(3 Suppl): S113-22.
- Kuipers, M. E., H. G. de Vries, et al. (1999). "Synergistic fungistatic effects of lactoferrin in combination with antifungal drugs against clinical *Candida* isolates." Antimicrob Agents Chemother **43**(11): 2635-41.
- Kullberg, B. J., M. G. Netea, et al. (1999). "Modulation of neutrophil function in host defense against disseminated *Candida albicans* infection in mice." FEMS Immunol Med Microbiol **26**(3-4): 299-307.
- Lacasse, M., C. Fortier, et al. (1990). "Experimental oral candidosis in the mouse: microbiologic and histologic aspects." J Oral Pathol Med **19**(3): 136-41.
- Leghmari, K., Y. Bennasser, et al. (2008). "HIV-1 Tat protein induces IL-10 production by an alternative TNF-alpha-independent pathway in monocytes: role of PKC-delta and p38 MAP kinase." Cell Immunol **253**(1-2): 45-53.
- Leigh, J. E., C. Steele, et al. (1998). "Th1/Th2 cytokine expression in saliva of HIV-positive and HIV-negative individuals: a pilot study in HIV-positive individuals with oropharyngeal candidiasis." J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol **19**(4): 373-80.
- Lenander-Lumikari, M. (1992). "Inhibition of *Candida albicans* by the Peroxidase/SCN-/H₂O₂ system." Oral Microbiol Immunol **7**(5): 315-20.
- Lewandowski, D., M. Marquis, et al. (2006). "Altered CD4+ T cell phenotype and function determine the susceptibility to mucosal candidiasis in transgenic mice expressing HIV-1." J Immunol **177**(1): 479-91.
- Lipman, M. C., M. A. Johnson, et al. (1995). "Changes to alveolar macrophage phenotype in HIV infected individuals with normal CD4 counts and no respiratory disease." Thorax **50**(7): 777-81.
- Lopez-De-Blanc, S. A., N. Salati-De-Mugnolo, et al. (2002). "Antifungal topical therapy in oral chronic candidosis. A comparative study." Med Oral **7**(4): 260-70.
- Lucey, D. R., R. E. Hensley, et al. (1991). "CD4+ monocyte counts in persons with HIV-1 infection: an early increase is followed by a progressive decline." J Acquir Immune Defic Syndr **4**(1): 24-30.
- Lupetti, A., A. Paulusma-Annema, et al. (2000). "Candidacidal activities of human lactoferrin peptides derived from the N terminus." Antimicrob Agents Chemother **44**(12): 3257-63.

- Mangino, G., Z. A. Percario, et al. (2007). "In vitro treatment of human monocytes/macrophages with myristoylated recombinant Nef of human immunodeficiency virus type 1 leads to the activation of mitogen-activated protein kinases, I κ B kinases, and interferon regulatory factor 3 and to the release of beta interferon." J Virol **81**(6): 2777-91.
- Mantovani, A., A. Sica, et al. (2004). "The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization." Trends Immunol **25**(12): 677-86.
- Marino, M. W., A. Dunn, et al. (1997). "Characterization of tumor necrosis factor-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(15): 8093-8.
- Marquis, M., D. Lewandowski, et al. (2006). "CD8+ T cells but not polymorphonuclear leukocytes are required to limit chronic oral carriage of *Candida albicans* in transgenic mice expressing human immunodeficiency virus type 1." Infect Immun **74**(4): 2382-91.
- Martinez, F. O., L. Helming, et al. (2008). "Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective." Annu Rev Immunol.
- Mirani, M., I. Elenkov, et al. (2002). "HIV-1 protein Vpr suppresses IL-12 production from human monocytes by enhancing glucocorticoid action: potential implications of Vpr coactivator activity for the innate and cellular immunity deficits observed in HIV-1 infection." J Immunol **169**(11): 6361-8.
- Mocroft, A., C. Oancea, et al. (2005). "Decline in esophageal candidiasis and use of antimycotics in European patients with HIV." Am J Gastroenterol **100**(7): 1446-54.
- Montagnoli, C., A. Bacci, et al. (2002). "B7/CD28-dependent CD4+CD25+ regulatory T cells are essential components of the memory-protective immunity to *Candida albicans*." J Immunol **169**(11): 6298-308.
- Montal, M. (2003). "Structure-function correlates of Vpu, a membrane protein of HIV-1." FEBS Lett **552**(1): 47-53.
- Murciano, C., E. Villamon, et al. (2006). "Killed *Candida albicans* yeasts and hyphae inhibit gamma interferon release by murine natural killer cells." Infect Immun **74**(2): 1403-6.
- Murciano, C., E. Villamon, et al. (2006). "Impaired immune response to *Candida albicans* in aged mice." J Med Microbiol **55**(Pt 12): 1649-56.
- Murciano, C., A. Yanez, et al. (2008). "Influence of aging on murine neutrophil and macrophage function against *Candida albicans*." FEMS Immunol Med Microbiol **53**(2): 214-21.

- Naglik, J. R., P. L. Fidel, Jr., et al. (2008). "Animal models of mucosal *Candida* infection." FEMS Microbiol Lett **283**(2): 129-39.
- Nanci, A. and A. R. Ten Cate (2003). Ten Cate's oral histology : development, structure, and function. St. Louis, Mosby.
- Nantel, A. (2006). "The long hard road to a completed *Candida albicans* genome." Fungal Genet Biol **43**(5): 311-5.
- Netea, M. G., G. D. Brown, et al. (2008). "An integrated model of the recognition of *Candida albicans* by the innate immune system." Nat Rev Microbiol **6**(1): 67-78.
- Netea, M. G., R. Suttmuller, et al. (2004). "Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells." J Immunol **172**(6): 3712-8.
- Netea, M. G., C. A. Van Der Graaf, et al. (2002). "The role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 in the host defense against disseminated candidiasis." J Infect Dis **185**(10): 1483-9.
- Netea, M. G., J. W. van Der Meer, et al. (1999). "Fas-FasL interactions modulate host defense against systemic *Candida albicans* infection." J Infect Dis **180**(5): 1648-55.
- Netea, M. G., A. G. Vonk, et al. (2003). "Differential role of IL-18 and IL-12 in the host defense against disseminated *Candida albicans* infection." Eur J Immunol **33**(12): 3409-17.
- Nielsen, H., A. Kharazmi, et al. (1986). "Blood monocyte and neutrophil functions in the acquired immune deficiency syndrome." Scand J Immunol **24**(3): 291-6.
- Nikawa, H., L. P. Samaranayake, et al. (1993). "The fungicidal effect of human lactoferrin on *Candida albicans* and *Candida krusei*." Arch Oral Biol **38**(12): 1057-63.
- Niyonsaba, F. and H. Ogawa (2005). "Protective roles of the skin against infection: implication of naturally occurring human antimicrobial agents beta-defensins, cathelicidin LL-37 and lysozyme." J Dermatol Sci **40**(3): 157-68.
- Noble, S. M. and A. D. Johnson (2007). "Genetics of *Candida albicans*, a diploid human fungal pathogen." Annu Rev Genet **41**: 193-211.
- Nottet, H. S., L. de Graaf, et al. (1993). "Phagocytic function of monocyte-derived macrophages is not affected by human immunodeficiency virus type 1 infection." J Infect Dis **168**(1): 84-91.

- Olivetta, E. and M. Federico (2006). "HIV-1 Nef protects human-monocyte-derived macrophages from HIV-1-induced apoptosis." Exp Cell Res **312**(6): 890-900.
- Olivetta, E., Z. Percario, et al. (2003). "HIV-1 Nef induces the release of inflammatory factors from human monocyte/macrophages: involvement of Nef endocytotic signals and NF-kappa B activation." J Immunol **170**(4): 1716-27.
- Olivetta, E., D. Pietraforte, et al. (2005). "HIV-1 Nef regulates the release of superoxide anions from human macrophages." Biochem J **390**(Pt 2): 591-602.
- Paul, W. E. (2003). Fundamental immunology. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins.
- Percario, Z., E. Olivetta, et al. (2003). "Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Nef activates STAT3 in primary human monocyte/macrophages through the release of soluble factors: involvement of Nef domains interacting with the cell endocytotic machinery." J Leukoc Biol **74**(5): 821-32.
- Pirofski, L. A. and A. Casadevall (2009). "Rethinking T cell immunity in oropharyngeal candidiasis." J Exp Med **206**(2): 269-73.
- Pivarsci, A., L. Bodai, et al. (2003). "Expression and function of Toll-like receptors 2 and 4 in human keratinocytes." Int Immunol **15**(6): 721-30.
- Pivarsci, A., L. Kemeny, et al. (2004). "Innate immune functions of the keratinocytes. A review." Acta Microbiol Immunol Hung **51**(3): 303-10.
- Plackett, T. P., E. D. Boehmer, et al. (2004). "Aging and innate immune cells." J Leukoc Biol **76**(2): 291-9.
- 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): 2177-88.
- Pope, M. (1999). "Mucosal dendritic cells and immunodeficiency viruses." J Infect Dis **179** Suppl 3: S427-30.
- Poudrier, J., X. Weng, et al. (2003). "The AIDS-like disease of CD4C/human immunodeficiency virus transgenic mice is associated with accumulation of immature CD11bHi dendritic cells." J Virol **77**(21): 11733-44.
- 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): 6377-91.

- Rabeneck, L., M. M. Crane, et al. (1993). "A simple clinical staging system that predicts progression to AIDS using CD4 count, oral thrush, and night sweats." J Gen Intern Med **8**(1): 5-9.
- Renshaw, M., J. Rockwell, et al. (2002). "Cutting edge: impaired Toll-like receptor expression and function in aging." J Immunol **169**(9): 4697-701.
- Rogers, T. J. and E. Balish (1980). "Immunity to *Candida albicans*." Microbiol Rev **44**(4): 660-82.
- Romani, L. (1999). "Immunity to *Candida albicans*: Th1, Th2 cells and beyond." Curr Opin Microbiol **2**(4): 363-7.
- Romani, L. (2008). "Cell mediated immunity to fungi: a reassessment." Med Mycol: 1-15.
- Schroder, K., M. J. Sweet, et al. (2006). "Signal integration between IFN γ and TLR signalling pathways in macrophages." Immunobiology **211**(6-8): 511-24.
- Shallo, H., T. P. Plackett, et al. (2003). "Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and macrophage infiltration into the skin after burn injury in aged mice." Burns **29**(7): 641-7.
- Sherman, M. P., C. M. de Noronha, et al. (2001). "Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr." J Virol **75**(3): 1522-32.
- Soukka, T., J. Tenovuo, et al. (1992). "Fungicidal effect of human lactoferrin against *Candida albicans*." FEMS Microbiol Lett **69**(3): 223-8.
- Strebel, K. (2003). "Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev." AIDS **17 Suppl 4**: S25-34.
- Sutmuller, R. P., M. H. den Brok, et al. (2006). "Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells." J Clin Invest **116**(2): 485-94.
- Swift, M. E., A. L. Burns, et al. (2001). "Age-related alterations in the inflammatory response to dermal injury." J Invest Dermatol **117**(5): 1027-35.
- Szolnoky, G., Z. Bata-Csorgo, et al. (2001). "A mannose-binding receptor is expressed on human keratinocytes and mediates killing of *Candida albicans*." J Invest Dermatol **117**(2): 205-13.
- Takakura, N., H. Wakabayashi, et al. (2004). "Effect of orally administered bovine lactoferrin on the immune response in the oral candidiasis murine model." J Med Microbiol **53**(Pt 6): 495-500.

- Tasat, D. R., R. Mancuso, et al. (2003). "Age-dependent change in reactive oxygen species and nitric oxide generation by rat alveolar macrophages." *Aging Cell* **2**(3): 159-64.
- Tomee, J. F., P. S. Hiemstra, et al. (1997). "Antileukoprotease: an endogenous protein in the innate mucosal defense against fungi." *J Infect Dis* **176**(3): 740-7.
- van Enckevort, F. H., M. G. Netea, et al. (1999). "Increased susceptibility to systemic candidiasis in interleukin-6 deficient mice." *Med Mycol* **37**(6): 419-26.
- van Loon, L. A., S. R. Krieg, et al. (1989). "Quantification and distribution of lymphocyte subsets and Langerhans cells in normal human oral mucosa and skin." *J Oral Pathol Med* **18**(4): 197-201.
- Vazquez-Torres, A. and E. Balish (1997). "Macrophages in resistance to candidiasis." *Microbiol Mol Biol Rev* **61**(2): 170-92.
- Vazquez-Torres, A., J. Jones-Carson, et al. (1999). "Early resistance of interleukin-10 knockout mice to acute systemic candidiasis." *Infect Immun* **67**(2): 670-4.
- Vazquez, N., T. Greenwell-Wild, et al. (2005). "Human immunodeficiency virus type 1-induced macrophage gene expression includes the p21 gene, a target for viral regulation." *J Virol* **79**(7): 4479-91.
- Wellington, M., K. Dolan, et al. (2009). "Live *Candida albicans* suppresses production of reactive oxygen species in phagocytes." *Infect Immun* **77**(1): 405-13.
- Wetzel, M. A., A. D. Steele, et al. (2002). "The effect of X4 and R5 HIV-1 on C, C-C, and C-X-C chemokines during the early stages of infection in human PBMCs." *Virology* **292**(1): 6-15.
- Whiteway, M. and C. Bachewich (2007). "Morphogenesis in *Candida albicans*." *Annu Rev Microbiol* **61**: 529-53.
- Whiteway, M. and U. Oberholzer (2004). "Candida morphogenesis and host-pathogen interactions." *Curr Opin Microbiol* **7**(4): 350-7.
- Woods, J. A., J. M. Davis, et al. (1999). "Exercise and cellular innate immune function." *Med Sci Sports Exerc* **31**(1): 57-66.
- Wormley, F. L., Jr., J. Cutright, et al. (2003). "Multiple experimental designs to evaluate the role of T-cell-mediated immunity against experimental vaginal *Candida albicans* infection." *Med Mycol* **41**(5): 401-9.

- Xu, L. L., M. K. Warren, et al. (1996). "Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro." J Leukoc Biol **60**(3): 365-71.
- Yang, Y. L. (2003). "Virulence factors of Candida species." J Microbiol Immunol Infect **36**(4): 223-8.
- Yang, Y. L., H. J. Lo, et al. (2006). "Effect of prolonged HAART on oral colonization with Candida and candidiasis." BMC Infect Dis **6**: 8.
- Zelante, T., A. De Luca, et al. (2009). "IL-17/Th17 in anti-fungal immunity: what's new?" Eur J Immunol **39**(3): 645-8.

ANNEXE 1 - MILIEUX ET TAMPONS

Milieu RPMI supplémenté modifié

RPMI 1640 sans rouge de phénol

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

Tampon nettoyant pour les tissus

TRIS	20 mM
NaCl	20 mM
EDTA	40 mM
DTT	1 mM

Compléter à 100 ml avec de l'eau distillée stérile

Milieu Krebs Ringer Phosphate Glucose (KRPG)

NaCl	145 mM
Phosphate de sodium	5,7 mM
KCl	4,86 mM
CaCl ₂	0,54 mM
Glucose	5,5 mM

Ajuster le pH à 7,35

Solution de Ringer 100%

NaCl 2,250 g

KCl 0,105 g

CaCl₂.2H₂O 0,120 g

NaHCO₃ 0,050 g

Compléter avec 1 L d'eau distillée

Autoclaver

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

Solution de lyse des érythrocytes

NH₄Cl 155 mM

KHCO₂ 10 mM

EDTA 0,1 mM

Compléter à 1L avec de l'eau distillée stérile

