Institut national de la recherche scientifique

Institut Armand Frappier

## **Rôle du hypoxia inducible factor 1α (HIF-1α) durant la leishmaniose viscérale**

### Par

### Akil Hammami

Thèse présentée pour l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.) en Immunologie et Virologie

Jury d'évaluation

Examinateur Interne	<b>Dr Albert Descoteaux</b> INRS - Institut Armand Frappier
Examinateurs Externes	<b>Dr Jérôme Estaquier</b> Centre hospitalier de l'université Laval (CHUL)
	<b>Dr Martin Richer</b> Université McGill
Directeur de recherche	<b>Dre Simona Stäger</b> INRS - Institut Armand Frappier
	INRS – IAF
	2017

### Résumé

Bien que l'inflammation soit essentielle pour le remodelage des réponses immunitaires et le contrôle des infections, elle est souvent associée à la pathogenèse lors des maladies chroniques. *Leishmania donovani*, l'agent causatif de la leishmaniose viscérale, induit rapidement une forte inflammation au début de l'infection. Les tissus inflammés sont caractérisés par une diminution drastique de la quantité d'oxygène disponible pour les cellules, favorisant ainsi un microenvironnement hypoxique et permettant une surexpression et une stabilisation du facteur de transcription ``Hyoxia Inducible Factor`` (HIF-1 $\alpha$ ). Ce facteur est un régulateur clé des réponses face à un manque en oxygène et joue un rôle primordial dans les changements métaboliques qui confèrent aux cellules une meilleure adaptation. De plus, HIF-1 $\alpha$  dirige une panoplie de fonctions des cellules immunitaires incluant la phagocytose et la différenciation cytotoxique de cellules T. L'expression et la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les leucocytes sont assurées non seulement par l'hypoxie mais aussi par d'autres facteurs souvent associés au stress pathologique comme l'inflammation et l'infection. Récemment, il a été montré que les promastigotes de *Leishmania* stabilisent aussi le HIF-1 $\alpha$  dans les macrophages infectés *in vitro*.

Dans ce travail, nous cherchons en premier lieu, durant la phase aigüe de l'infection, à comprendre le rôle du HIF-1 $\alpha$  dans les cellules dendritiques (DC) ainsi que ses effets sur la régulation des réponses des cellules T CD8 dans les souris infectées. Nos résultats indiquent que lors de l'infection par *L. donovani*, les souris avec une déplétion spécifique HIF-1 $\alpha$  dans les cellules qui expriment le marqueur CD11c, ont une expansion améliorée des cellules T CD8 accompagnée d'une augmentation de la fréquence des cellules effectrices de courte durée de vie (SLEC). De plus les DCs présentent une expression d'IL-12 bien soutenue durant cette phase. Ainsi, l'absence du HIF-1 $\alpha$  dans les cellules CD11c<sup>+</sup> permet une diminution significative de la charge parasitaire de la rate. Remarquablement, nos résultats montrent clairement que l'expression de HIF-1 $\alpha$  dans les DCs est induite d'une manière dépendante du facteur de transcription IRF-5, ce qui permet de déduire que les fortes réponses inflammatoires ont pour effet de limiter l'expansion des cellules T CD8 spécifiques pour l'antigène.

*Leishmania donovani*, induit une intense myélopoèise durant la phase chronique de l'infection. Ce phénomène est accompagné par une splénomégalie, une inflammation chronique, une destruction tissulaire ainsi qu'une immunosuppression. Dans un tel environnement hypoxique, nos résultats montrent que HIF-1 $\alpha$  altère la production de l'IL-12 par les DCs conduisant à une limitation de développement des réponses Th1. Par ailleurs, la déplétion de HIF-1 $\alpha$  dans les cellules CD11c<sup>+</sup> entraîne une expression permanente plus élevée de l'IL-12, simultanément avec une inhibition de la production de l'IL-10. En effet, les souris qui sont dépourvues spécifiquement de HIF-1 $\alpha$  montrent une amélioration significative de la fréquence des cellules T CD4 productrices d'IFN- $\gamma$  aussi bien dans la rate que dans la moelle osseuse.

Le parasite favorise aussi une sortie massive des monocytes à partir de la moelle osseuse. Ces monocytes sont dotés d'un phénotype régulateur. En outre, quand les cellules myéloïdes atteignent la rate elles acquièrent, d'une manière dépendante de HIF-1 $\alpha$ , des fonctions semblables à celles des cellules suppressives dérivées des lignées myéloïdes (MDSC). De plus, HIF-1 $\alpha$  est impliqué dans la polarisation des macrophages vers un phénotype similaire à celui des M2. Enfin, nos résultats confirment encore le contrôle efficace de la charge parasitaire en absence de HIF-1 $\alpha$  dans la rate ainsi que dans la moelle osseuse. L'ensemble des données suggère que la voie de HIF-1 $\alpha$  pourrait être un mécanisme d'invasion adopté par le parasite afin de maintenir une infection persistante.

## **DEDICACES**

Je dédie ce travail :

À ma tendre mère Nadia et à mon cher père Ameur,

Comme faible reconnaissance de tout ce qu'ils ont sacrifié pour faire de moi ce que je suis aujourd'hui. Qu'ils trouvent dans ce travail l'expression de mes profonds sentiments et de mon parfait respect.

A mon frère Med Hedi et ma sœur Hiba,

Qu'ils soient toujours remerciés pour toute l'aide qu'ils m'ont fournie et à laquelle je serai toujours redevable.

A tous mes amis,

Qui n'ont pas cessé de m'encourager et de me soutenir pendant les moments difficiles, je leur souhaite la réussite et tout le bonheur du monde.

A toute ma famille,

A tous ceux qui m'ont aidé et qui, par oubli, n'ont pas été cités.

### Remerciements

Mes remerciements les plus sincères vont en premier lieu à ma encadreure et directrice de recherche, le Docteure Simona Stäger, pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour la confiance qu'elle m'a accordée. Je suis heureux de lui témoigner l'expression de mon respect et ma profonde gratitude.

Je remercie amplement, mes collègues et coéquipiers pour leur disponibilité, leur bienveillance et leur soutien continu.

Ce travail a été le sujet d'une précieuse collaboration et contribution de la part de Dre Krista Heinonen et Belma Melda Abidin, qu'elles trouvent ici l'expression de toute ma gratitude.

Mes remerciements les plus distingués s'adressent également aux illustres Docteurs Albert Descoteaux, Jérôme Estaquier et Martin Richer pour avoir accepté de juger ce travail.

Je remercie également tout le personnel et les étudiants de l'INRS IAF pour leur gentillesse et générosité.

## Table des matières

Abré	eviations	1
Intro	oduction	4
I.	Leishmanioses : Parasites et Maladies	5
1.	Historique	5
2.	Parasites	6
a)	Leishmania : Cycle de vie dimorphique	8
b)	Parasite : stade promastigote chez le vecteur	11
c)	Parasite : stade amastigote chez l'hôte mammifère	12
3)	Maladie et épidémiologie	15
a)	La leishmaniose viscérale	17
b)	La leishmaniose cutanée	18
c)	La leishmaniose mucocutanée	18
d)	La leishmaniose cutanée diffuse	18
e)	La leishmaniose dermique post Kala Azar	19
II.	Immunologie de la leishmaniose	21
1.	Leishmaniose cutanée	22
2.	La leishmaniose viscérale	26
a)	La LV dans le foie	26
b)	La LV dans la rate	28
3.	La LV : Cytokines et inflammation	30

III.	Facteur inductible par l'hypoxie (HIF)	33
1.	Induction et régulation	33
2.	HIF-1α : Rôle et régulation dans les cellules du système immunitaire	37
a)	Régulation métabolique	37
b)	HIF-1 $\alpha$ dans les cellules T	38
c)	HIF-1α dans les cellules myéloïdes	39
d)	HIF-1a dans les cellules dendritiques	41
3.	HIF-1α dans les différents modèles d'infection	44
a)	Les infections bactériennes	44
b)	Infections virales	45
C)	Infections parasitaires	46
4.	HIF-1a et Leishmania	47
IV.	Délimitation du sujet de recherche	49
Chaj	pitre 1	52
Résun	né	53
IRF-:	5-mediated inflammation limits CD8 <sup>+</sup> T cell expansion by	54
induc	cing HIF-1 $\alpha$ and impairing dendritic cell functions during	
Leish	mania infection	
Abstra	act	55
Autho	or summary	56
Introd	luction	57
Result	ts	60

VI

1.	IRF-5-mediated inflammation limits CD8 <sup>+</sup> T cell expansion during acute infection	60
2.	Upregulation of HIF-1 $\alpha$ in the spleen restricts CD8 <sup>+</sup> T cell expansion	61
3.	L. donovani infection induces HIF-1 $\alpha$ expression in CD11c <sup>hi</sup> splenic DCs in	63
	an IRF-5-dependent manner	
4.	HIF-1 $\alpha$ expression in CD11c <sup>+</sup> cells limits expansion of CD8 <sup>+</sup> T cells and	63
	favours the induction of MPEC	
5.	HIF-1a hampers IL-12 expression by splenic CD11c <sup>hi</sup> DCs	65
6.	HIF-1 $\alpha$ expression in CD11c <sup>+</sup> cells exacerbates disease	66
Discu	ssion	68
Mater	ial and Methods	74
Ackno	owledgments	79
Refer	ences	80
Figur	e legends	89
Suppl	emental Figure legends	93
Figur	es	95
Suppl	emental Figure	102
Cha	pitre 2	107
Résun	né	108
HIF-	$1\alpha$ is a key regulator in potentiating suppressor activity and	109
limiti	ng the microbicidal capacity of MDSC-like cells during	

visceral leishmaniasis

Abstr	act	110
Autho	or summary	111
Intro	duction	112
Resul	ts	115
1.	Myeloid cells, particularly Ly6C <sup>hi</sup> and Ly6C <sup>lo/int</sup> monocytes, accumulate in the spleen of <i>L. donovani</i> infected mice over the course of infection	115
2.	HIF-1 $\alpha$ - deficient mice in CD11c <sup>+</sup> cells show increased frequency and numbers of inflammatory monocytes in the spleen	116
3.	HIF-1 $\alpha$ induces an M2-like phenotype and limits leishmanicidal capacity in myeloid cells	118
4.	HIF-1 $\alpha$ enhances the inhibitory functions of myeloid cells during chronic VL	120
5.	HIF-1 $\alpha$ deficient intermediate stage monocytes are more resistant to <i>L</i> . <i>donovani</i> infection under hypoxic conditions	121
6.	CD11c-specific HIF-1α-knockout mice produce more monocyte's progenitors and display enhanced output of inflammatory monocytes in the bone marrow	123
7.	HIF-1 $\alpha$ expression in CD11c $^{\scriptscriptstyle +}$ cells exacerbates infection in the bone marrow	124
Discu	ssion	125
Mate	rial and Methods	131
Ackn	owledgements	138
Refer	ences	139
Figur	e legends	147
Supp	lemental Figure legend	152

VIII

Figur	es	155
Supp	lemental Figure	164
Cha	pitre 3	172
Résu	né	173
HIF- chro	$1\alpha$ hampers dendritic cell function and Th1 generation during nic visceral leishmaniasis	174
Abstr	ract	175
Intro	duction	176
Resul	ts	178
1. 2.	Cell-specific ablation of HIF-1 $\alpha$ in CD11c <sup>+</sup> cells increases the recruitment of CD4 T cells to the spleen and enhances Th1 responses HIF-1 $\alpha$ deficiency in CD11c <sup>+</sup> cells results in stronger Th1 responses in the	178 180
3.	bone marrow Dendritic cell migration to the spleen is not affected by the absence of HIF- $1\alpha$	181
4. Disou	HIF-1 $\alpha$ expression alters DC functions	182 184
Meth	ods	187
Refer	ences	190
Ackn	owledgments	194
Leger	nds to figures	195

IX

Discussion générale	204
1. Le rôle de HIF-1α dans les cellules dendritiques durant la LV aigue	205
2. Le rôle de HIF-1α dans les cellules myéloïdes durant la LV chronique	210

## **Références bibliographiques**

198

218

## Liste des Figures

## Introduction

Figure 1 : Les formes promastigote et amastigote du parasite Leishmania	9
Figure 2: Cycle de transmission de <i>Leishmania</i>	10
Figure 3 : Cycle de vie de <i>Leishmania</i> chez le phlébotome	14
Figure 4 : Répartition géographique des leishmanioses	20
<b>Figure 5 :</b> Représentation schématique des différentes cytokines et des voies de régulation de la réponse immunitaire durant la LC	25
Figure 6 : Représentation schématique de la régulation du HIF-1α	35
Chapitre 1	
<b>Figure 1 :</b> IRF-5-mediated inflammation limits CD8 <sup>+</sup> T cell expansion during acute <i>L. donovani</i> infection	95
<b>Figure 2 :</b> Up regulation of HIF-1 $\alpha$ in the spleen restricts CD8 <sup>+</sup> T cell expansion	96
<b>Figure 3 :</b> <i>L. donovani</i> infection induces HIF-1 $\alpha$ expression in CD11c <sup>hi</sup> splenic DCs in an IRF-5 dependent manner	97
<b>Figure 4 :</b> HIF-1 $\alpha$ expression in CD11c <sup>+</sup> cells limits expansion of CD8 <sup>+</sup> T cells	98
<b>Figure 5 :</b> Depletion of HIF1 $\alpha$ in CD11 $c^+$ cells induces more SLECs during the	99

XI

acute phase of L. donovani infection

<b>Figure 6 :</b> HIF-1α hampers dendritic cell function	100
<b>Figure 7 :</b> HIF-1 $\alpha$ expression in CD11c <sup>+</sup> cells exacerbates disease	101
Figure S1	102
Figure S2	103
Figure S3	104
Figure S4	105
Figure S5	106
Chapitre 2	
<b>Figure 1 :</b> Myeloid cells, particularly Ly6C <sup>hi</sup> and Ly6C <sup>lo/int</sup> monocytes, accumulate in the spleen of <i>L. donovani</i> infected mice over the course of infection	155
<b>Figure 2 :</b> HIF-1 $\alpha$ - deficient mice in CD11c <sup>+</sup> cells show increased frequency and numbers of inflammatory monocytes in the spleen	156
<b>Figure 3 :</b> HIF-1 $\alpha$ induces an M2-like phenotype and limits leishmanicidal capacity in myeloid cells	157
<b>Figure 4 :</b> <i>L. donovani</i> amastigotes strongly induce iNOS production in HIF-1α- deficient BMM	158
<b>Figure 5 :</b> HIF-1 $\alpha$ governs glucose metabolism in L. donovani infected splenocytes	159

**Figure 6 :** HIF-1 $\alpha$  enhances the inhibitory functions of myeloid cells during 160 chronic VL

<b>Figure 7 :</b> HIF-1 $\alpha$ deficient intermediate stage monocytes are more resistant to <i>L</i> . <i>donovani</i> infection under hypoxic conditions	161
<b>Figure 8 :</b> CD11c-specific HIF-1 $\alpha$ -knockout mice produce more monocyte's progenitors and display enhanced output of inflammatory monocytes in the bone marrow	162
<b>Figure 9 :</b> HIF-1 $\alpha$ expression in CD11c <sup>+</sup> cells exacerbates infection in the bone marrow	163
Figure S1	164
Figure S2	165
Figure S3	166
Figure S4	167
Figure S5	168
Figure S6	169
Figure S7	170
Chapitre 3	
<b>Figure 1 :</b> CD11c-specific HIF-1 $\alpha$ ablation results in lower parasite burdens in the spleen and bone marrow	198
<b>Figure 2 :</b> HIF-1 $\alpha$ expression in CD11c <sup>+</sup> cells limits expansion of Th1 cells during chronic visceral leishmaniasis	199

**Figure 3 :**HIF-1 $\alpha$  deficiency in CD11c<sup>+</sup> cells results in stronger Th1 responses in the bone marrow 200

Figure 4 : Dendritic cell migration to the spleen is not affected by the absence of HIF-1 $\alpha$	201
<b>Figure 5 :</b> HIF-1α expression alters DC functions	202
Figure S1	203
Discussion	
<b>Figure 1 :</b> Rôle de HIF-1 $\alpha$ dans les DCs durant la phase aigüe de la VL	209
Figure 2 : Rôle de HIF-1 $\alpha$ dans les DCs durant la phase chronique de la VL	216

**Figure 3 :** Rôle de HIF-1α dans les cellules myéloïdes durant la phase aigüe de la VL

### Liste des tableaux

Tableau 1 : Espèces de Leishmania qui causent la maladie humaine	16
Chapitre 2	
Tableau 1 : Amorces utilisées pour la qPCR	171

## Abréviations

$A_{2A}R$	Récepteur adénosine 2A			
ADP	Adénosine diphosphate			
Ag	Antigène			
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique			
ATP	Adénosine triphosphate			
BMDC	Bone marrow derived dendritic cell			
BMM	Bone marrow derived macrophage			
CHM	Complexe d'histocompatibilité majeur			
CR	Récepteur du complément CR			
CTL	Cellule cytotoxique			
DC	Cellule dendritique			
EBV	Virus d'Epstein-Barr			
EOMES	Eomesodermin			
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor			
GMP	Précurseur de granulocytes et monocytes			
GP	Glycoproteine			
HBV	Virus de l'Hépatite B			
HCV	Virus de l'Hépatite C			
HIF	Hypoxia inducible factors			
HK2	Hexokinase 2			
HPV	Virus de papilloma			
HRE	Hypoxia response element			
HTLV	Virus de leucémie des cellules T			
IFN	Interféron			
Ig	Immunoglobuline			
IL	Interleukine			
iNOS	Inducible nitric oxide synthase			

IRF-5	Interferon regulatory factor			
LAG	Lymphocyte activated gene			
LC	Leishmaniose cutanée			
LCD	Leishmaniose Cutanée Diffuse			
LCD	Leishmaniose cutanée diffuse			
LCL	Leishmaniose Cutanée Localisée			
LCMV	Virus de choriomeningite lymphocytaire			
LDPK	Leishmaniose dermique post Kala Azar			
LMC	Leishmaniose mucocutanée			
LOHA	N-hydorxy-L-arginine			
LPG	Lipophosphoglycan			
LPS	Lipopolysaccharide			
LV	Leishmaniose viscérale			
MAPK	Mitogen-activated protein kinase			
MDSC	Myeloid-derived suppressor cells			
Mo-MDSC	Monocyte-MDSC			
MPEC	Cellules T précurseurs de mémoire			
NK	Natural killer			
NO	Monoxyde d'azote			
PBMC	Cellule mononucléaire périphérique du sang			
PD	Programmed death			
PDH	Pyruvate déshydrogénase			
PDK-1	Pyruvate déshydrogénase kinase-1			
PHD	Prolyl hydoxylases			
PI3K	Phosphoinositol-3-kinase			
PMN	Ploymorphonucléaire			
PMN-MDSC	Ploymorphonucléaire-MDSC			
PSG	Promastigote secretory gel			
ROS	Éléments réactifs d'oxygène			

Short-lived effector cell			
Signal transducer and activator of transcription			
Small ubiquitin-like modifier			
Tumor associated macrophage			
Transcription factor TBX21			
Cellule T de mémoire centrale			
T cell receptor			
T helper			
Toll like receptor			
facteur de nécrose tumoral			
Cellule T régulatrice			
Vascular cell adhesion molecule 1			
Vascular endothelial growth			
Von Hippel-Lindau			
virus d'immunodéficience humain			
Very late antigen 4			
Vacuole parasitophore			
Vesicular stomatitis virus			

# Introduction

#### I. Leishmanioses : Parasites et Maladies

#### 1. Historique

A travers l'histoire, l'Homme était infecté par un grand nombre de parasites, environ 300 espèces, dont 70 sont des protozoaires. Malgré le nombre important de parasites touchant les êtres humains, seules près de 90 espèces provoquent les maladies connues. L'intérêt pour les maladies parasitaires est aussi ancien que l'humanité. En effet, les premiers rapports enregistrés remontent à l'antiquité et plus spécifiquement durant l'ancienne Égypte (1500 ans A.J.) où on note la description de la filariose de Médine causée par *Dracunculus medunensis*.

La découverte des parasites protozoaires dotés d'une taille extrêmement petite par rapport au vers, est relativement plus tardive. Cela est devenu possible avec l'utilisation des microscopes, il y a quatre siècles. Les leishmanies sont des parasites potentiellement pathogènes, leur présence a été révélée par une maladie grave accompagnée d'une forte fièvre et marquée par l'existence d'une pigmentation, anciennement connue en Inde sous le nom de "Kala Azar" (fièvre noire). En 1885, et pour la première fois, Cunningham observe un micro-organisme à l'intérieur des macrophages issus d'une lésion cutanée. Six ans plus tard en 1901, Leishman identifie des micro-organismes dans les frottis de rate d'un patient décédé de la ''fièvre de dumdum'' en provenance de Calcutta en Inde. À première vue, ces organismes ont été identifiés comme des trypanosomes. Deux ans plus tard, en 1903, Donovan les décrit pour la première fois comme un nouveau genre et il les qualifie comme " corps de Leishman-Donovan". Le lien entre le "Kala Azar" et ces micro-organismes est établi plus tard par Ross en les appelant Leishmania donovani. En 1903 Wright reporte les premières données concernant la leishmaniose cutanée en décrivant l'agent infectieux au niveau d'une lésion cutanée chez une jeune fille. La similitude entre les micro-organismes observés dans les lésions cutanées et ceux mis en évidence dans la forme viscérale est soulignée par Mesnil en 1904. En 1906, Lithe attribue à ces derniers, le nom de Leishmania, alors que l'agent pathogène impliqué dans les lésions cutanées du "Bouton d'Orient" est nommé Leishmania (L.) tropica. Nicolle et Comte (1908) découvrent les mêmes protozoaires chez le chien, puis chez le cheval et le chat. L'ensemble de ces constatations a fait que la leishmaniose soit considérée comme maladie commune à l'Homme et aux autres mammifères et ouvrent des perspectives pour les recherches épidémiologiques. En 1910, et pour la première fois, Pedrosa et Da Silva réussissent à cultiver in vitro le parasite L. braziliensis. Les

travaux de recherche se poursuivent alors que la validation du taxon de la variété *major* n'est apparue qu'en 1973 par Bray et ses collaborateurs. Encore plus tardivement *L. tropica* et *L. major* sont identifiées comme étant deux espèces distinctes (Cox, 2003).

#### 2. Parasites

Les Leishmanioses sont un groupe de maladies parasitaires transmises aux mammifères, y compris l'Homme, par la piqure infectante d'insectes diptères hématophages appelés les phlébotomes. Les agents pathogènes causatifs sont des protozoaires du genre Leishmania (Dedet, 1998). Les Leishmanies sont des parasites principalement zoonotiques et affectent de très nombreuses espèces sauvages et domestiques.

Selon Levine et al. (1980) la classification est la suivante :

Règne :	Protistat (Haeckel, 1866)		
Sous – règne :	Protozoa (Goldfuss, 1817 ; Siebold, 1848)		
Embranchement :	Sarcomastigophora (Honigberg et Balamuth, 1963		
Sous – Embranchement :	Mastigophora (Diesing, 1866)		
Classe :	Zoomastigophorea (Calkins, 1909)		
Ordre :	Kinetoplastida (Honigberg, 1963 ; Vickerman 1976)		
Sous – ordre :	Trypanosomatina (Kent, 1880)		
Famille :	Trypanosomatidae (Doflein, 1901 ; Grobben 1905)		
Genre :	Leishmania (Ross, 1903)		

Le genre *Leishmania* comprend trois sous-genres : *Leishmania* (Ross, 1903), *Viannia* (Lainson et al., 1987) et *Sauroleishmania* (Bates, 2007). La multiplication des parasites chez l'insecte vecteur diffère selon le sous-genre. En effet, le sous-genre *Leishmania* se multiplie seulement dans l'intestin moyen alors que *Viannia* se multiplie dans l'intestin moyen et supérieur. Quant au *Sauroleishmania*, leur lieu de multiplication sera plutôt l'intestin supérieur et l'intestin moyen antérieur. Ce dernier groupe ne présente aucune virulence pour les mammifères et infecte spécifiquement les reptiles contrairement aux deux autres sous-genres.

Les leishmanies alternent entre deux stades morphologiques différents : les amastigotes et les promastigotes. Les amastigotes présentent la forme intracellulaire du parasite et se trouvent essentiellement dans des vacuoles parasitophores à l'intérieur des macrophages de l'hôte vertébré, alors que les promastigotes présentent la forme extracellulaire mobile vivant dans le tube digestif du vecteur, généralement les phlébotomes.

Les leishmanioses sont classées en deux catégories : zoonotique et anthropo-zoonotique selon la nature du réservoir. Malgré que 13 parmi les 15 espèces de *Leishmania* causant la maladie sont zoonotiques, l'Homme peut être infecté accidentellement en s'exposant au cycle de transmission du parasite (Gramiccia and Gradoni, 2005). Alors que dans la forme anthropo-zoonotique, constituée principalement par les deux espèces *L. donovani* et *L. tropica*, l'Homme présente l'unique réservoir (WHO, 2017). Cependant, la présence d'un hôte réservoir animal pour ces deux espèces a été reportée dans plusieurs régions endémiques notamment le Maroc, le Soudan et le nord d'Israël pour *L. donovani* (Dereure *et al.*, 2003; Dereure *et al.*, 1991; Jacobson, 2003) ainsi que l'Iran pour *L. tropica* (Mohebali *et al.*, 2005).

Les rongeurs et les canidés constituent les principaux réservoirs présents dans l'ancien monde alors qu'au nouveau monde ce sont les primates, les mammifères et les chauves-souris (Pinto et al., 2001).

Les leishmanioses sont des maladies à plusieurs formes et présentent un large spectre de manifestations cliniques qui dépendent en même temps de l'espèce du parasite impliquée au moment de l'infection ainsi que des répertoires génétique et immunologique de l'hôte (Grevelink et Lerner, 1996). Généralement, chez l'Homme, la maladie se présente sous trois formes principales, à savoir la leishmaniose viscérale, la leishmaniose cutanée, et la leishmaniose muco-cutanée (Evans, 1993a; Evans, 1993b; Roberts et al., 2000).

#### a) Leishmania : Cycle de vie dimorphique

Au cours de son cycle de vie le parasite *Leishmania* alterne entre deux formes morphologiques distinctes : la forme amastigote dans les vacuoles parasitophores des macrophages de l'hôte et la forme promastigote dans le tube digestif de l'insecte vecteur (Alexander et Russell, 1992; Handman, 1999) (Fig. 2). Quand le parasite infecte l'hôte mammifère, il commence une cascade de changements physiques et métaboliques liés principalement à la variation de la température ainsi qu'au changement du pH (Antoine et al., 1998). Parmi tous les arthropodes, les phlébotomes représentent les vecteurs spécifiques du *Leishmania*. En effet, ces vecteurs appartiennent à la famille des *Phlebotominae* qui contient 13 genres dont seulement deux genres sont impliqués dans le nouveau monde. Ces insectes sont des diptères hématophages de taille minuscule de 2 à 5 mm (Depaquit et al., 1998; Killick-Kendrick, 1990). Cependant un troisième genre *Sergentomyia* se qualifie comme un vecteur porteur du sous genre *Sauroleishmania*. Ce sont des insectes qui se nourrissent sur les reptiles ainsi que d'autres vertébrés (Bates, 2007).

Comme tout être vivant nocturne, les insectes sont plus actifs après le coucher du soleil à des températures plus appropriées (à 19°C ou plus) et en absence du vent. Alors que pendant le jour, ils se cachent dans des endroits humides et à l'abri de la lumière. Ce phénomène donne une explication plus claire sur la répartition spatio-temporelle des leishmanioses. Effectivement, les vecteurs sont présents toute l'année dans les régions tropicales alors que leur présence se limite seulement aux saisons chaudes dans les régions tempérée. De manière comparable aux autres insectes hématophages, seule la femelle peut transmettre le parasite d'un réservoir infecté à un hôte non infecté lors de son repas sanguin, qui est indispensable au développement et à la maturation des œufs (Antoine et al., 1998).





Figure 1 : Les formes promastigote et amastigote du parasite Leishmania.

(A) La forme promastigote, extracellulaire et mobile, présente chez l'insecte vecteur et dans les milieux de culture *in vitro* (d'après : <u>https://www.pinterest.com/pin/552676185505992453/</u>) (B) La forme amastigote, intracellulaire et immobile, située a l'intérieur du macrophage de l'hôte. (D'après : <u>https://microbeonline.com/nnn-medium-composition-procedure-and-results/</u>).



#### Figure 2: Cycle de transmission de Leishmania

Le cycle de transmission de *Leishmania* est constitué de 2 phases : le passage du parasite sous la forme promastigote de la lumière du tube digestif du phlébotome vecteur de la maladie, vers les vacuoles parasitophores des cellules phagocytaires mononuclées de l'hôte mammifère, où il entame son changement vers la forme amastigote et se multiplie. (D'après Stuart *et al.*, 2008 avec modifications).

#### b) Parasite : stade promastigote chez le vecteur

Le cycle de vie du *Leishmania* commence suite à un repas sanguin de l'insecte vecteur sur un hôte infecté. Le sang représente un repas riche en nutriments mais contient entre-autres des macrophages infectés pas le parasite sous la forme amastigote. Les parasites intracellulaires se libèrent une fois que les cellules qui les contiennent sont ingérées, se différentient rapidement en promastigotes procycliques non infectieux et vivent dans le tube digestif des diptères. Cette forme est caractérisée par sa mobilité ainsi que sa faculté à survivre à l'extérieur de la cellule. Les promastigotes présentent un corps allongé de 15 à 20µm de longueur et 1 à 4µm de largeur et ils sont dotés d'un flagelle situé à l'extrémité antérieure et qui peut atteindre jusqu'à 20µm de longueur (Fig 1A).

La survie des promastigotes à l'intérieur du tube digestif du vecteur rencontre une contrainte majeure qui consiste à résister aux enzymes protéolytiques (Fig. 3). La présence de la matrice péritrophique permet la transformation d'environ 50% des parasites en promastigotes procycliques (Rogers et al., 2002b). Avant d'être injectés dans un hôte lors du repas sanguin suivant, les parasites passent par plusieurs sous-stades de promastigotes. En effet lors de leur passage à travers le long du tube digestif du vecteur, on trouve par ordre : les nectomonades (la forme qui réussit à se détacher de la matrice péritrophique et se coller aux cellules épithéliales), les leptomonades (dotés d'une forme moins longue et secrétant le PSG (promastigote secretory gel) un élément essentiel dans la transmission), les méta-cycliques (forme infectieuse du parasite) et les haptomonades.

Les haptomonades sont nécessaires pour transmettre le parasite lors de la piqure. En effet, ils forment une bague de parasites qui bouche l'entrée de la valve stomodéale en restant collés et attachés à la paroi, ce qui permettra la migration de quelques parasites méta-cycliques vers l'œsophage, le pharynx et finalement au proboscis du phlébotome afin d'attendre l'hôte mammifère (Kamhawi, 2006) (Fig 3).

#### c) Parasite : stade amastigote chez l'hôte mammifère

Les promastigotes méta-cycliques infectieux sont inoculés dans l'hôte mammifère à travers la salive sur le site de la piqure (Fig. 2). La salive est essentielle pour le passage des parasites, en effet, elle contient des éléments immuno-modulateurs qui permettent l'inhibition de l'activité antiparasitaire comme la production du monoxyde d'azote (NO) ainsi que la présentation antigénique (Katz et al., 2000). En outre, il a été démontré dans la leishmaniose expérimentale dans le modèle murin que la co-inoculation de parasites et d'homogénats de glande salivaires entraîne l'exacerbation de la maladie (Belkaid et al., 1998; Kamhawi et al., 2000).

La transmission du parasite au sein de l'hôte déclenche l'action du système immunitaire inné et le met face au système du complément ainsi qu'aux cellules phagocytaires. De ce fait, les parasites qui réussissent à s'échapper de l'activité lytique du complément seront phagocytés en premier lieu par les neutrophiles et les monocytes ensuite par les macrophages (Romano et al., 2017) à travers différents récepteurs et/ou ligands tels que les récepteurs du complément CR1 et CR3, les ligands parasitaires notamment le LPG et la GP63, les récepteurs du fucose-mannose, les récepteurs de la protéine C réactive, ainsi que par l'opsonisation via des opsonines de l'hôte (C3b, C3bi) (Bogdan et Rollinghoff, 1998; Mosser et Brittingham, 1997; Romano et al., 2017). Les macrophages internalisent les parasites par la phagocytose (Rittig et Bogdan, 2000). Par la suite les parasites seront enfermés dans des phagosomes néoformés par l'élongation et l'excision de la membrane plasmique de la cellule (Antoine et al., 1998). Une fois formé, les phagosomes migrent à l'intérieur du cytoplasme et entament certains changements afin de former un organite appelé vacuole parasitophore (VP). Les VP présentent un microenvironnement favorable pour la différenciation des promastigotes en amastigotes intracellulaires capables de résister et de se développer dans les macrophages de l'hôte (Zilberstein et Shapira, 1994). Les amastigotes ont une forme ovoïde immobile et mesurent entre 2.5 et 5µm de diamètre selon l'espèce (Fig. 1B).

Suite à la fusion avec les lysosomes, les VP acquièrent une activité de phagolysosome. En outre le contenu des VP devient acide et riche en enzymes lysosomales actives. Les amasigotes qui échappent à ces activités se multiplient. Plusieurs modèles décrivent la dissémination de *Leishmania* à l'intérieur de l'hôte, le plus adapté consiste à un éclatement de macrophages infectés libérant un grand nombre d'amastigotes qui vont infecter d'autres macrophages avoisinants. Néanmoins, les amastigotes peuvent être également libérés par exocytose suite à

une accumulation de VP à la périphérie des cellules infectées, ce phénomène a été bien observé après plusieurs heures d'infection des macrophages (Rittig et al., 1998). Les récepteurs fuccosemannose, le CR3 et les récepteurs  $Fc_{\Upsilon}$  sont essentiels pour la fixation et l'ancrage des amastigotes à la surface des macrophages.

La réplication et la dissémination des parasites diffèrent selon la forme de la maladie. En effet, la réplication des amastigotes est locale et se restreint au tissu entourant la piqure initiale lors de la leishmaniose cutanée. Alors que pour la leishmaniose viscérale, les parasites sont véhiculés à travers la circulation sanguine afin d'atteindre la rate, le foie et la moelle osseuse.

Lors d'un prochain repas sanguin sur un hôte infecté, les amastigotes présents à l'intérieur des macrophages sont aspirés avec le sang par un phlébotome femelle. Ainsi, les parasites entament une série de changements métaboliques et morphologiques dans le tube digestif de l'insecte jusqu'à atteindre le stade promastigote méta-cyclique. D'où le cycle parasitaire de *Leishmania* sera bouclé (Fig. 2).



Figure 3 : Cycle de vie de *Leishmania* chez le phlébotome.

Représentation schématique de la différenciation en fonction du temps des différentes formes morphologiques des promastigotes dans le tube digestif de l'insecte vecteur (D'après Kamhawi, 2006 ; avec modifications).

#### 3) Maladie et épidémiologie

Les leishmanioses diffèrent par la forme de la maladie dont trois sont plus fréquentes et vastement réparties. La forme de la maladie dépend directement de l'espèce du parasite qui infecte l'hôte ainsi que de la localisation géographique. Selon les estimations de l'organisation mondiale de la santé, et malgré qu'une minorité (qui ne dépasse pas les 30% de sujets infectés) développe la maladie, il y aurait entre 700 000 et 1 million de nouveaux cas de leishmaniose enregistrés, chaque année, causant 20 000 à 30 000 décès (WHO, 2017). Les leishmanioses font parties des maladies parasitaires considérées comme majeures. Les leishmanioses sont réparties sur tous les continents sauf l'Antarctique, et représentent un réel problème de santé publique pour la population mondiale (Desjeux, 2001, 2004). Les différentes formes sont localisées dans les régions tropicales et subtropicales du globe (Fig. 4). Deux grandes répartitions géographiques sont distinguées ; l'Ancien Monde (Sud de l'Europe, Afrique, Proche-Orient et Asie) et le Nouveau Monde (Amériques du Nord, du Sud et Centrale). Les espèces provoquant les différentes manifestations cliniques observées sont spécifiques de chacun des deux mondes et même d'une zone géographique bien délimitée (Banuls et al., 2007). Ainsi, les leishmanioses sont endémiques dans 98 pays et 350 millions de personnes sont exposées au risque de piqures de phlébotomes à travers le monde. Le tableau 1 récapitule les principales espèces causant la maladie chez l'Homme (Reithinger et al., 2007).

	Forme pathologique	Cycle detransmission	Distribution géographique principale			
Espèces de Leishmania de l'Ancien Monde						
L (Leishmania)* aethiopica	LCL, LCD	Zoonotique	Ethiopie, Kenya			
L (Leishmania)* killicki	LCL	Zoonotique	Afrique du Nord			
L (Leishmania)* major	LCL	Zoonotique	Asie Centrale, Afrique du Nord, Moyen Orient, Afrique de l'Est			
L (Leishmania)* tropica	LCL	Anthroponotique	Asie Centrale, Moyen Orient, Parties de l'Afrique du Nord, Sud Est de l'Asie			
L (Leishmania)* donovani	LCL, viscérale	Anthroponotique	Afrique, Asie Centrale, Sud Est de l'Asie			
Espèces de Leishmania de l'A	ncien et du Nou	veau Mondes				
L (Leishmania)* infantum	LCL, viscérale	Zoonotique				
Espèces de Leishmania du No	uveau Monde					
L (Viannia)* braziliensis	LCL, muqueuse	Zoonotique	Amérique du Sud, parties del'Amérique centrale			
L (Viannia)* panamensis	LCL, muqueuse	Zoonotique	Nord de l'Amérique du Sud, Sud de l'Amérique centrale			
L (Viannia)* peruviana	LCL	Zoonotique	Pérou			
L (Viannia)* guyanensis	LCL	Zoonotique	Amérique du Sud			
L (Viannia)* lainsoni	LCL	Zoonotique	Amérique du Sud			
L (Viannia)* colombiensis	LCL	Zoonotique	Nord de l'Amérique du Sud			
L (Leishmania)* amazonensis	LCL, LCD	Zoonotique	Amérique du Sud			
L (Leishmania)* mexicana	LCL, LCD	Zoonotique	Amérique centrale, Mexique, USA			
L (Leishmania)* pifanoi	LCL	Zoonotique	Amérique du Sud			
L (Leishmania)* venezuelensis	LCL	Zoonotique	Nord de l'Amérique du Sud			
L (Leishmania)* garnhami	LCL	Zoonotique	Amérique du Sud			

**Tableau 1** : Espèces de Leishmania qui causent la maladie humaine (Reithinger et al., 2007)

LCL : Leishmaniose Cutanée Localisée LCD : Leishmaniose Cutanée Diffuse \* Sous genres indiqués entre parenthèses Le Sud Est de l'Asie inclut le sous-continent indien et la Chine.

#### a) La leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale (LV) est répartie sur 61 pays dans les quatre continents (Fig. 4A). En effet, environ 200 millions de personnes sont à risque d'exposition à la maladie. Selon les estimations de l'organisation mondiale de la santé, près de 50 000 à 90 000 nouveaux cas de LV auront lieu chaque année. Il existe deux types de LV; la LV anthropo-zoonotique dont l'Homme représente l'unique réservoir de l'espèce L. donovani et la LV zoonotique causée principalement par L. infantum dont le chien est le réservoir. Les autres espèces comme L. tropica au Moyen Orient et L. amazonensis en Amérique de sud sont occasionnellement viscérotropes (Guerin et al., 2002). La LV est considérée comme la forme la plus sévère des leishmanioses. Les manifestations cliniques de cette forme de maladie varient d'un état asymptomatique ou infraclinique, oligosymptomatique, à une maladie complète (Kala Azar) (Murray et al., 2005). Les signes cliniques sont: une fièvre irrégulière, une pâleur témoin d'une anémie et une splénomégalie associée généralement avec une hépatomégalie (Murray et al., 2005). La maladie est fatale si les patients sont privés de traitement. La mort survient suite à la détérioration de l'état général du sujet, aux disfonctionnements de plusieurs systèmes vitaux ainsi qu'à l'immuno-suppression. Par conséquent, dans la plupart des cas, le décès peut survenir suite à une infection secondaire qui est hors du contrôle du système immunitaire des sujet immunoincompétents (Roberts et al., 2000).

Habituellement, une minorité de sujets développe la maladie suite au contact avec le vecteur infecté. Par ailleurs, en cas d'immunodépression (infection par le VIH), il y aura une évolution rapide vers le stade final de la maladie. En effet, la co-infection *Leishmania*/VIH augmente dramatiquement les risques de développement d'une forme clinique de leishmaniose ainsi que le une rechute. Ces deux affections conjuguées provoquent immunodéficience et par conséquent une fréquence de mortalité plus élevée. Ainsi, la LV est considérée comme un des facteurs majeurs de décès chez les sujets co-infectés dans les zones endémiques comme le sub-continent indien (WHO, 2017).

#### b) La leishmaniose cutanée

La leishmaniose cutanée (LC) est endémique dans plus de 70 pays à travers le monde (Fig. 4B). Plusieurs espèces de *Leishmania* sont responsables de la LC (Tab. 1). La période d'incubation peut s'étaler de quelques jours à plusieurs mois. Suite à une piqûre par un phlébotome infecté, une petite papule rouge apparaît au site. Généralement, elle se développe en ulcère qui se propage sous une mince croûte. La guérison spontanée requiert quelques mois, voire quelques années (2-3 ans), en fonction du site de la lésion et de l'espèce de *Leishmania*. Les lésions peuvent être multiples et sont souvent retrouvées sur les parties non couvertes du corps, alors que la taille de la lésion peut varier de quelques millimètres à quelques centimètres de diamètre. (Ashford, 2000).

#### c) La leishmaniose mucocutanée

La dissémination des espèces cutanées du Nouveau Monde (*L. braziliensis, L. panamensis, L. guyanensis*) aux muqueuses représente environ 10% des cas et se développe habituellement entre 1 à 5 ans après guérison d'une LC. Cependant, la leishmaniose mucocutanée (LMC) peut coïncider avec des lésions actives de LC avec une prévalence d'environ 90% (Blum *et al.*, 2004; Machado-Coelho *et al.*, 2005). Idem pour la LC, les manifestations cliniques commencent par une petite papule rouge au site de piqûre qui se transforme en ulcère. La première lésion finit par guérir mais l'infection se propage à des zones mucocutanées, notamment la région nasopharyngée, où elle évolue vers la dégénérescence des tissus, souvent accompagnée par des nécroses ou des infections bactériennes. La LMC peut entraîner une grande déformation au niveau des lèvres, nez, pharynx et larynx. Suite à de graves problèmes respiratoires, ou à cause d'infections secondaires, la LMC pourrait être fatale (Murray *et al.*, 2005).

#### d) La leishmaniose cutanée diffuse

La leishmaniose cutanée diffuse (LCD) a été rapportée en Éthiopie et au Kenya dans l'Ancien Monde et elle est due à *L. aethiopica*. Dans le nouveau monde, cette forme de la maladie a été décrite au Venezuela et en République Dominicaine, où elle est causée par *L. amazonensis*. (Murray *et al.*, 2005). La LCD apparaît suite à une infection par des parasites causant habituellement une LC et se développe d'une manière associée à une anergie spécifique ou à une déficience de la réponse immunitaire (Ashford, 2000). Les lésions, qui sont généralement très riches en parasites, peuvent être de petite taille et isolées, comme elles peuvent s'étaler sur tout le corps (Ashford, 2000).

#### e) La leishmaniose dermique post Kala Azar

La leishmaniose dermique post Kala Azar (LDPK) est localisée dans le subcontinent Indien et en Afrique de l'Est. Elle est causée par *L. donovani* (Murray *et al.*, 2005). La LDPK peut apparaître quelques mois voire même deux ans après le traitement et la guérison complète d'une LV (Ashford, 2000). En outre, au Soudan, la LDPK se manifeste chez la moitié des patients jusqu'à 6 mois après diagnostic d'une LV. Selon la localisation géographique, 20 à 60% des sujets infectés auparavant développent la LDPK. Cette forme de leishmaniose est principalement une répercussion de la leishmaniose viscérale. Elle se manifeste par une éruption maculaire, papuleuse ou nodulaire localisée habituellement sur le visage et la partie supérieure des sujet affectes, ainsi que sur d'autres parties du corps (WHO, 2017). Ces sujets constituent un énorme réservoir de parasites pour des nouvelles infections, vu qu'ils sont porteurs d'une grande charge parasitaire dans leur peau et spécifiquement dans les lésions (Kedzierski et Evans, 2014).


B)



Figure 4 : Répartition géographique des leishmanioses.

(A) Leishmaniose viscérale. (B) Leishmaniose cutanée (WHO, 2017)

A)

## II. Immunologie de la leishmaniose

La leishmaniose est classée comme l'une des maladies les plus négligées. En effet, elle occupe le second rang en terme d'estimation sur le nombre de personnes atteintes à travers le monde ainsi que le quatrième rang dans la morbidité de la maladie par rapport aux autres infections tropicales (Bern et al., 2008).

La leishmaniose est une maladie qui présente plusieurs difficultés en termes de traitements. Ces traitements sont lourds et présentent une toxicité assez élevée accompagnée de plusieurs effets secondaires. Ils sont basés sur des composés chimiques tels que les antimoniales (Sodium stibogluconate). Cependant, il existe une seconde lignée de traitements qui implique l'utilisation des diamidines aromatiques (pentamidine) et des amphotericine B (kedzierski et al., 2009).

Bien que les traitements anti-*Leishmania* soient utilisés depuis 70 ans, de nos jours il n'existe aucun vaccin approuvé. Cela peut être clairement expliqué par nos connaissances limitées de la pathogenèse du parasite ainsi que par la complexité des réponses immunitaires nécessaires pour la protection.

Chez l'hôte mammifère, les réponses cellulaires anti *-Leishmania* jouent un rôle primordial car elles permettent l'activation classique des macrophages afin de tuer les parasites. D'un autre côté, et malgré la puissante réponse humorale durant l'infection, des études ont démontré que les anticorps ne jouent aucun rôle dans la protection. En revanche, récemment dans notre laboratoire on a décrit que l'hyper-gamma-globulinémie est bien induite suite à une activation des cellules B, lors de l'infection par *L. donovani* ce qui entraîne l'exacerbation de la maladie (Silva-Barrios et al, 2016).

La nature de l'immunité déclenchée contre *Leishmania* a fait surgir de longs débats entre les scientifiques. En effet, des études utilisant le modèle murin d'infection ont bien souligné l'importance des cellules T auxiliaires (T helper (Th)). Toutefois, le couple Th1/Th2 était seulement associé à la forme cutanée de la maladie, alors que pour la LV, il était loin d'être appliqué (kedzierski et Evans, 2014). De plus, et malgré les différences des réponses antiparasitaires entre le modèle murin et l'Homme, le rôle des cellules T ainsi que leur implication sont toujours confirmés.

#### 1. Leishmaniose cutanée

Les macrophages constituent un tropisme de premier rang pour les parasites de *Leishmania*. Les parasites profitent davantage des capacités phagocytaires afin d'être internalisés et se répliquer dans des phagosomes (Reiner et Locksley, 1995). Néanmoins, ces cellules jouent un rôle essentiel dans l'élimination du parasite, une fois activées par la voie classique. L'internalisation des parasites déclenche la production des éléments réactifs d'oxygène (ROS) qui permettront à leur tour l'induction de l'oxyde nitrique (NO) ainsi que la N-hydroxy-L-arginine (LOHA). Ces molécules, seront utilisées dans l'élimination du pathogène (Liew et al., 1990; Iniesta et al., 2001). L'efficacité de ce processus dépend cependant de l'espèce causative de la LC. Par exemple, il a été démontré que la production du super oxyde est nécessaire dans le cas le *L. amazonensis* (Mukbel et al., 2007). L'infection des macrophages permet la production d'une panoplie de cytokines pro-inflammatoires telles que l'interleukine 12 (IL-12), l'interleukine 6 (IL-6) et le facteur de nécrose tumorale (TNF) ainsi que des chimiokines. Cette production entraîne le recrutement, dans le site de l'infection, des cellules pro-inflammatoires telles que les neutrophiles, les monocytes et les cellules dendritiques.

Dans les travaux de recherche sur la LC, le rôle des neutrophiles est contradictoire en terme de résistance ou d'exacerbation de la maladie (Peters et Sacks, 2009). En revanche, ces cellules qui sont suspectées d'aider la propagation du parasite juste au début de l'infection (Laskay et al., 2003) seront les premières à être recrutées sur le site de l'infection via la chimiokine CXCL8 (Venuprasad et al., 2002). En effet, plusieurs études ont montré *in vitro* que les neutrophiles possèdent quelques activités leishmanicides, ce qui confère à ces cellules une certaine importance dans la réponse immunitaire précoce contre les promastigotes (Carlsen et al., 2013). Cependant, *in vivo* le parasite persiste sur le site d'infection ce qui indique que l'élimination directe de cet agent pathogène par les neutrophiles semble insuffisante pour contrôler de la charge parasitaire ainsi que éviter le développement des signes cliniques. De plus divers travaux ont reporté que les promastigotes peuvent avoir une durée de vie prolongée à l'intérieur des neutrophiles. De ce fait une partie de ces cellules qui n'arrive pas à tuer le parasite semble responsable de sa dissémination (Laufs et al., 2002; Ritter et al., 2009). Néanmoins les neutrophiles jouent un rôle important dans le recrutement d'autres cellules immunitaires sur le site d'infection (Peters et Sacks, 2009).

Le site de la piqûre constitue un micro-environnement largement affecté par les cytokines proinflammatoires dans lequel, les DCs immatures rencontrant d'antigène (Ag), subissent une maturation et migrent vers les ganglions lymphatiques drainants (Randolph, 2001). Habituellement un petit nombre de parasites sont internalisés directement par les DCs, tout au début de l'infection. Toutefois, la majorité des DCs sont infectées suite à un contact direct avec les neutrophiles porteurs du pathogène (Peters et Sacks, 2009).

Dans la LC, les DCs de la peau et les DCs dermiques résidentes du tissu présentent l'Ag aux cellules T naïves (Von Stebut, 2007). En effet, l'internalisation des amastigotes par les DCs sur le site d'infection permet, d'une part la régulation en hausse de la production de l'IL-12 et d'autre part, l'augmentation de l'expression du complexe d'histocompatibilité majeur de type I et II (MHC I et MHC II) ainsi que des molécules de co-stimulation à leurs surfaces. Dans l'ensemble, les DCs matures migrent vers la zone des cellules T via l'expression du récepteur de chimiokine CCR7 et fournissent les trois signaux nécessaires pour l'amorçage des cellules T CD4 et CD8 naïves afin qu'elles deviennent spécifiques pour l'Ag de *Leishmania* (Von Stebut et al., 1998).

Les cellules T jouent un rôle déterminant dans l'expression des réponses effectrices et mémoires. La protection contre la LC est fortement liée au déclenchement des Th1 et la production de l'IFN<sub>Y</sub>. En effet, les études expérimentales sur le modèle murin ont démontré que la résistance chez les souris C57BL/6 par exemple, est assurée par de fortes réponses de type Th1 produisant de l'IFN<sub>Y</sub> qui activent classiquement à leur tour, les macrophages en phénotype M1 afin de produire l'NO nécessaire pour l'élimination des parasites intracellulaires. Alors que dans des souches susceptibles de souris comme les BALB/c, les cellules CD4 se différencient en Th2 effectrices produisant l'interleukine 4 (IL-4) induisant par la suite des réponses humorales dans les cellules B qui produisent massivement des anticorps habituellement non spécifiques. De plus l'IL-4 permet l'activation non classique des macrophages en phénotype M2. Cette activation rend les cellules phagocytaires plus susceptibles aux parasites qui se multiplient dans un milieu favorable permettant à la maladie d'évoluer (Scott, 1989).

L'IFN<sub>Y</sub> et le TNF sont souvent synergiques et leur équilibre assure une réponse effectrice hautement efficace (Bogdan et al., 1990).

Le complexe Th1/Th2 dans la LC dépend essentiellement de la nature des cytokines produites. En effet et bien que l'IL-4, qui est secrété par les keratinocytes, soit associée à un manque de résistance contre le parasite, comme expliqué auparavant, elle peut aussi induire la production de l'IL-12 par les DCs, si seulement elles sont présentes tout au début de l'infection (Biedermann et al., 2001).

Chez le modèle souris ainsi que pour l'Homme, la susceptibilité ou la résistance contre le parasite, sont influencées par la présence dans la peau des cellules T régulatrices (Treg)  $CD4^+CD25^+$  Foxp3<sup>+</sup>. Cette population limite les dommages du tissu sur le site de l'infection, contrebalance les réponses inflammatoires et participe à la suppression des réponses immunitaires contre le pathogène. Ce mécanisme agit principalement par la production d'une cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Interleukine 10) (Belkaid et Rouse, 2005 ; Campanelli et al., 2006). Une autre population de cellules T CD4 qui coproduit IFN<sub>Y</sub> et l'IL-10 a été bien observée dans la leishmaniose cutanée chronique. Ces cellules Tr1 semblent avoir un profil similaire au celui des Th1 (Anderson et al., 2007).

Les réponses des cellules T CD8 sont essentielles lors de la LC. Les CD8 participent à la protection avec deux fonctions principales qui consistent en leur activité cytotoxique ainsi qu'au développement des Th1 via la production de l'IFN<sub>Y</sub> (Belkaid et al., 2002). En effet, une fois amorcées par les DCs, les cellules CD8 naïves se différencient en cellules cytotoxiques (CTL) produisant des molécules effectrices comme le granzyme, la perforine ainsi que Fas/FasL simultanément avec la production d'IFN<sub>Y</sub>, de TNF et d'IL-2. Plusieurs études ont mis en évidence la présence des CD8 polyfonctionnelles durant la LC. En outre, chez l'Homme, les CD8 sont recrutées au site de l'infection et produisent le granzyme A, ce qui entraîne une destruction du tissu et par conséquent engendre une action anti-parasitaire (Faria et al., 2009). Dans le modèle murin, le rôle des cellules T CD8 est plutôt controversé. En effet, les premiers travaux ont montré que ces cellules sont moins importantes pour le contrôle du pathogène lors d'une infection primaire alors qu'elles participent majoritairement lors de la réinfection (Muller et al., 1993). Cependant, ces cellules semblent fondamentales pour résoudre une infection primaire quand les souris sont infectées à faible dose parasitaire (Belkaid et al., 2002).

Le développement de la réponse humorale via les cellules B est souvent associé à la susceptibilité face à l'infection par *Leishmania*. L'hyper-gamma-globulinémie est un symptôme majeur de l'exacerbation de la maladie aussi bien chez l'Homme que dans les modèles expérimentaux chez la souris. De plus, les anticorps produits sont loins d'être considérés comme un facteur de résistance (Sacks et al., 1984). Les cellules B constituent aussi une source majeure de l'IL-10 durant l'infection ce qui inhibera la production de l'IL-12 par les DCs (Ronet el al., 2010).

La LC engendre la production de plusieurs cytokines. L'équilibre entre les cytokines gouverne directement la nature des réponses engendrées ce qui aura une implication directe sur l'élimination du parasite ou l'immuno-suppression. L'ensemble des cytokines ainsi que leur régulation des populations cellulaires est récapitulé dans la représentation schématique suivante :



Figure 5 : représentation schématique des différentes cytokines et des voies de régulation de la réponse immunitaire durant la LC (d'après Naspi et al., 2016).

#### 2. La leishmaniose viscérale

La LV est causée principalement par les espèces de L.donovani, L. infantum (chagasi). Le parasite se propage depuis le site d'infection et cible les macrophages résidents des viscères (rate et foie) et de la moelle osseuse. Chez l'Homme, la plupart des sujets infectés sont asymptomatiques, alors qu'une minorité développe des signes cliniques sévères. Chez ces sujets symptomatiques la maladie pourrait être fatale en absence de tout traitement approprié. Le parasite induit une immunosuppression menant à une infection chronique et la maladie devient plus grave souvent suite à une infection secondaire. Le mécanisme de la susceptibilité n'est pas encore clair et dépend de plusieurs paramètres tels que la nature de l'interaction entre l'hôte et le parasite ainsi que la nature et la complexité des réponses immunitaires engendrées. De plus, les facteurs génétiques sont assez impliqués. En effet, il a été montré que le gène Slc11a1/Nramp1 était associé à la protection contre la maladie et son absence entraîne une invasion totale du parasite (Vidal et al., 1995). Ce gène, qui code pour la chaîne de transport de fer à travers les phagosomes, est essentiel pour la régulation de plusieurs fonctions cellulaires dans les macrophages. En outre, il régule la production des CXC chimiokines et des cytokines incluant l'IL-1β ainsi qu'iNOS (Vidal et al., 1995; Blackwell et al., 2000). De plus, il joue aussi un rôle dans l'expression du MHC II par les DCs (Stober al al., 2007)

Chez l'Homme, les études cliniques qui visent les réponses immunitaires sont limitées par la difficulté d'accéder directement aux organes infectés. Dans la plupart des cas, elles se basent sur l'examen des cellules mononucléaires périphériques du sang (PBMC) ainsi que l'évaluation des cytokines dans le sérum. Cependant, la VL engendre des réponses à médiation cellulaire. Ainsi la stimulation des PBMC avec l'Ag de la *Leishmania* n'engendre aucune production de l'IFN<sub>Y</sub>. Ceci réduit l'importance des manipulations *in vitro* (Sacks et al., 1987). Face à ces handicaps, l'utilisation du modèle murin de la LV expérimentale constitue un choix primordial.

#### a) La LV dans le foie

Dans le modèle expérimental d'infection par *L. donovani*, agent causatif de la leishmaniose viscérale, le parasite infecte chroniquement les viscères et la moelle osseuse. Contrairement à la rate et malgré l'hépatomégalie, on remarque dans le foie que l'infection est résolue grâce à deux mécanismes principaux à savoir ; le développement de l'immunité des cellules T et la formation

des granulomes (Engwerda et al., 2004). En effet, les cellules de Kupffer résidentes du foie captent une bonne partie des parasites injectés (McElrath et al., 1996). A cause de la capacité réduite de ces cellules à neutraliser le parasites intracellulaires tout au début de l'infection, la charge parasitaire continue à augmenter dramatiquement dans le tissu. Durant ce temps, et à fin de combattre le pathogène, des structures inflammatoires spécifiques sont formées. Ces formations sont appelées des granulomes. Elles sont constituées par un noyau qui est formé par l'assemblage des cellules de Kupffer infectées, ainsi que par des lymphocytes mobiles en périphérie (Engwerda et al., 2004). Cette formation tire son importance du fait qu'elle présente un microenvironnement local rempli de cytokines inflammatoires nécessaires pour l'activation des fonctions antiparasitaires des macrophages de kupffer (Moore et al., 2013). Les granulomes passent par plusieurs étapes de maturation. Par ailleurs, les cellules de Kupffer sont activées assez rapidement jute au début de l'infection, suite à leur exposition aux signaux inflammatoires. Par la suite, elles secrètent une panoplie de cytokines et chimiokines nécessaires pour le recrutement d'autres cellules immunitaires incluant, des monocytes, des neutrophiles et des cellules T NK (Cotterell et al., 1999 ; Svensson et al., 2005). Ces derniers secrètent l'IFN $_{\gamma}$  et des chimiokines incluant le CXCL10, ce qui permettra par la suite le recrutement des cellules T CD8 et CD4, préalablement amorcées dans la rate et qui sont spécifiques pour l'Ag, afin d'achever la maturation des granulomes (Engwerda et al., 2000; Amprey et al., 2004; Beattie et al., 2010). Les formations hépatiques atteignent leur maturation finale vers quatre semaines post infection. Cette maturation va assurer une efficacité déterminante pour éliminer le pathogène et la charge parasitaire est significativement réduite vers huit semaines post-infection (Murray et al., 2001). Toutefois, on observe toujours la présence d'un nombre assez dérisoire de parasites dans le foie. Cette présence semble essentielle pour la résistance contre la réinfection à long terme (Stanley et al., 2007).

A travers cette réponse immunitaire dans le foie, plusieurs cytokines semblent indispensables pour le développement des granulomes et l'élimination du parasite. L'IFN<sub>Y</sub> à son tour, améliore l'activité leishmanicide des macrophages de kupffer (Stanley et al., 2007). Le TNF est également crucial pour l'assemblage et la maturation des granulomes (Kaye et al., 2004).

#### b) La LV dans la rate

La LV se manifeste par une infection persistante dans la rate accompagnée d'une splénomégalie. Étant un organe lymphoïde secondaire, la rate est dotée d'une architecture consolidée par plusieurs cellules immunitaires hautement spécialisées qui ont pour mission d'éliminer toutes les particules exogènes dans la circulation sanguine (Mebius et Kraal.2005).

Dans le modèle expérimental de l'infection par *L. donovani*, trois sous-populations de macrophages phagocytent la quasi-totalité des parasites qui arrivent à la rate. Ces macrophages se situent à différents endroits de la rate, d'où ils tirent leurs noms : les macrophages de la pulpe rouge, les macrophages de la zone marginale et finalement les macrophages métallophiliques (Gorak et al., 1998). Ces macrophages, et plus spécifiquement les deux dernières sous-populations, présentent une capacité innée considérable de tuer le parasite dont environ la moitié est éliminée au bout de 24 heures suivant l'infection (Gorak et al., 1998). Il a été démontré que cette élimination s'effectue grâce à un mécanisme qui dépend principalement du NO (Phillips et al., 2010).

L'amorçage des réponses adaptatives commencent à peine quelques heures après l'infection. En effet, les DCs s'activent en phagocytant les débris parasitaires libérés par les macrophages ou en ingérant les macrophages qui contiennent les parasites digérés (Stanley et al., 2007). Ensuite les DCs migrent vers la zone de cellules T et commencent à produire l'IL-12 afin d'initier les réponses protectrices spécifiques (Gorak et al., 1998).

Les cellules T CD8 représentent une composante essentielle dans l'immunité à médiation cellulaire dont plusieurs travaux ont essayé d'élucidé le rôle dans la protection. En effet, le transfert adoptif des cellules T CD8 spécifiques pour l'Ag entraîne une diminution considérable de la charge parasitaire (Polley et al., 2006). Ces cellules répondent à la stimulation par l'IL-12 ensuite contribuent à la protection par deux mécanismes à savoir d'une part, la production de cytokines telles que l'IFN<sub>Y</sub> nécessaires pour l'activation classique des macrophages et le TNF et d'autre part le développement des fonctions cytotoxiques et la sécrétion des molécules effectrices telles que les perforines et les granzymes (Tsagozis et al., 2005). Cependant, durant la phase aigüe, les cellules T CD8 présentent une expansion assez limitée et elles sont dotées d'un phénotype de précurseur de mémoire effectrice. Dans la phase chronique de l'infection, ces

cellules démontrent un profil d'épuisement caractérisé par une perte graduelle de leurs fonctions entre autres, une altération de la production de l' $IFN_{Y}$  et le TNF ainsi que la perte de leur capacité à dégranuler (Joshi et al., 2009). Par ailleurs, ces cellules finissent par entamer une voie apoptotique. L'épuisement des cellules T CD8 résulte de la régulation à la hausse des récepteurs d'inhibition sur leur surface incluant PD-1 (Joshi et al., 2009).

Les réponses des cellules T CD4 Th1 sont un pilier de la protection durant la LV (Murray, 1997) Les cellules T CD4 amorcées par les DCs à travers l'IL-12. Cette cytokine inflammatoire induit spécifiquement la transcription du facteur de transcription T-bet via la signalisation de STAT-4. Le T-bet induit à son tour, la production de l'IFN<sub>Y</sub> à travers la voie de STAT-1 ce qui entraîne la différenciation de la lignée de Th-1 (Zhu et al., 2010).

Durant la LV expérimentale, les cellules B entament une activation polyclonale. Cette activation contribue à l'exacerbation de la maladie et il en résulte une hyper-gamma-globulinémie (Bankoti et al., 2012, Silva et al., 2016). Par ailleurs, les cellules B captent l'Ag de *Leishmania* et régulent à la hausse l'expression des IgM sur leurs surfaces ainsi que d'autres isotypes d'Ig. Cependant, la majorité des IgGs qui circulent durant l'infection sont non spécifiques du parasite (Deak et al., 2010). Ainsi, la présence des cellules B dans la rate semble néfaste pour la protection. En effet, l'infection des souris  $\mu$ MT avec *L. donovani* résulte en une amélioration des fonctions cytotoxiques des cellules T CD8 accompagnée d'une augmentation de la fréquence des cellules avec un phénotype de mémoire effectrice, ainsi qu'une meilleure expansion des cellules T CD8 productrice de l'IFN<sub>Y</sub> (Bankoti et al., 2012). Récemment, il a été démontré dans notre laboratoire que les amastigotes activent les B à travers les TLRs endosomaux menant ainsi à la production de plusieurs cytokines incluant majoritairement l'IFN-I (IFN- $\beta$ ) et L'IL-10. L'action combinée de ces deux éléments semble responsable de l'hypergammaglobulinémie (Silva et al., 2016).

#### 3. La LV : Cytokines et inflammation

Durant l'infection, *L. donovani* déclenche une réponse immunitaire où l'équilibre des cytokines et chimiokines est assez compliqué. La résistance ou la susceptibilité face à l'infection n'est pas associée à un manque de cytokines inflammatoires mais elles dépendent plutôt des mécanismes de signalisation modulés par le micro-environnement. En effet, si l'IFN<sub>Y</sub> produit principalement par les Th1 CD4 semble fondamental pour l'activation des macrophages afin d'éliminer le parasite, plusieurs autres cytokines sont exprimées à un niveau élevé telles que TNF, IL-2, IL-6, IL-10, IL-27 et IP-10 sont détectés dans le sérum des patients humains (Kurkjian et al., 2006).

La rate représente le site d'amorçage des DCs qui sont la source principale de la cytokine proinflammatoire IL-12. Dans le modèle murin, un niveau élevé de l'IL-12 est déjà observé très tôt suite à l'infection (Engwerda et al., 1996). VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule 1) et son ligand VLA-4 (very late antigen 4) initient la production de l'IL-12 par les DCs et cette cytokine est responsable de l'amorçage des cellules T naïves ainsi que leur différentiation en cellules cytotoxiques (Stanley et al., 2008). L'inhibition de l'IL-12 est également associée à un niveau plus bas de l'IFN<sub>Y</sub>, TNF et NO dans le foie avec une charge parasitaire plus élevée (Engwerda et al., 1998). De plus l'IL-12 est nécessaire pour l'amorçage des cellules T CD4 Th1.

Étant une cytokine pro-inflammatoire, l'IL-6 est principalement produite par les macrophages activés et elle semble nécessaire pour le recrutement et l'activation d'autres macrophages ainsi que des monocytes (Hurst et al., 2001). Cependant, en l'absence de l'IL-6 les souris montrent un meilleur contrôle de la multiplication parasitaire (Murray, 2008).

Bien que la cytokine pro-inflammatoire TNF soit essentielle pour l'induction et le maintien des réponses protectrices dans le foie, elle représente un médiateur important de la pathologie dans la rate chroniquement infecté. Plusieurs sources sont identifiées dans les pulpes blanche et rouge pour la production de TNF (Engwerda et al., 1998). Le TNF est responsable de la destruction de l'architecture, le remodelage de la zone marginale, la perte des macrophages de la zone marginale et la mort des cellules stromales qui maintiennent la structure de la rate (Engwerda et al., 2002 ; Ato et al., 2002).

Le dysfonctionnement immunitaire dans la rate est caractérisé non seulement par l'inhibition des réponses des cellules T spécifiques à l'Ag via l'épuisement et l'apoptose (Joshi et al., 2009), mais aussi par la production des cytokines anti-inflammatoires principalement l'IL-10 et TGF-β (Stager et al., 2006). L'IL-10 étant une cytokine anti-inflammatoire, elle représente un facteur clé pour l'immunosuppression et l'exacerbation de la maladie. En effet, des études ont montré que le blocage de l'IL-10 contribue à la résolution de l'infection. De plus, les souris Il-10<sup>-/-</sup> sont hautement résistantes face au L. donovani (Murphy et al., 2001). Durant l'infection, plusieurs cellules produisent l'IL-10 dans la rate à savoir les DCs (Svensson et al., 2004), les macrophages (Miles et al., 2005), les cellules NK (Maroof et al., 2008), les cellules B (Bankoti ey al., 2012), les cellules Tr1 (Stager et al., 2006). Les cellules B qui produisent l'IL-10 inhibent les réponses spécifiques des cellules CD4 et CD8 ainsi que les cellules NK conduisant à une altération de la production des cellules T CD8 effectrices mémoires et la diminution des cellules T CD4 Th1 (Bankoti et al., 2012). Durant la phase chronique de l'infection, une autre population de CD4 caractéristique de l'évolution de la maladie produit l'IL-10 simultanément avec l'IFN<sub> $\gamma$ </sub> (Stager et al., 2006) .Dans le modèle expérimental, la présence du TNF à un niveau élevé, induit la sécrétion de l'IL-10 qui entraîne directement à son tour, la régulation à la baisse de l'expression du CCR7 sur la surface des DCs; ce qui inhibe leur fonction migratoire (Ato et al., 2002).

Récemment, il a été démontré que l'IL-27 est responsable de la différenciation d'une population de CD4 CD25- FoxP3- caractéristique de la phase chronique. Ces cellules qui sont classées comme des cellules régulatrices (Tr-1), sont polyfonctionnelles et coproduisent simultanément l'IL-10 et l'IFN<sub>Y</sub> (Stager et al., 2006, Resende et al., 2013). Cette population est détectée après deux semaines post infection et elle fait partie de plusieurs signes de la pathogenèse durant la LV (Stager et al., 2006; Owens et al., 2012).

Suite à une infection, le parasite de *Leishmania* réussit à échapper à la réponse immunitaire et assure sa survie à l'intérieur de l'hôte à travers divers mécanismes. Ces mécanismes se basent principalement sur un équilibre inflammatoire hautement critique qui balance entre une forte inflammation au début de l'infection et une immunosuppression déclenchée principalement à travers l'IL-10. De plus, la présence abondante des cytokines pro-inflammatoires et spécifiquement le TNF, engendre plus tard durant l'infection, une destruction de l'architecture de la rate qui lui confère le sens de coordination des réponses spécifiques. Cependant, le rôle caché

du micro-environnement inflammatoire dans le remodelage des réponses antiparasitaires nécessite d'être plus étudié. En effet, suite à une forte inflammation, l'activité cellulaire et métabolique intense contribue à une hypoglycémie, une acidification ainsi que une réduction du taux oxygène disponible dans le tissu consterné. Ce manque d'oxygène est connu sous le nom d hypoxie (Semenza, 1999). Plusieurs travaux récents dans le contexte du micro-environnement à caractère hypoxique, ont essayé de mettre en évidence le rôle du HIF-1 $\alpha$  comme régulateur physiologique clé, en état de stress cellulaire; évidement dans le cas de tumeurs ou de maladies auto-immunes ainsi qu'à la suite d'une infection (Yang et al., 2016 ; Semenza, 2015 ; Arena et al., 2017).

# **III.** Facteur inductible par l'hypoxie (HIF)

### 1. Induction et régulation

L'élimination des pathogènes intracellulaires nécessite l'action des cytokines pro-inflammatoires ainsi que la sécrétion des molécules cytotoxiques afin d'induire la mort ou la lyse des cellules infectées. Ce processus entraîne généralement la destruction du tissu infecté accompagnée d'une forte inflammation menant à un changement du microenvironnement tissulaire. Les tissus inflammés présentent plusieurs caractéristiques communes telles que l'hypoglycémie, l'acidose, l'abondance des radicaux libres d'oxygène et l'hypoxie. L'hypoxie locale résulte habituellement d'un manque de flux d'oxygène, d'une activité métabolique accélérée, ainsi que d'un recrutement important des cellules inflammatoires vers le tissu en question.

Les facteurs inductibles par l'hypoxie (Hypoxia inducible factors: HIFs) constituent une grande famille de facteurs de transcription primordiale pour orchestrer les réponses cellulaires en état de manque d'oxygène ou d'hypoxie. En effet, ces facteurs sont nécessaires pour les cellules afin de surmonter le stress issu d'une forte inflammation et leur permettent de gouverner l'ensemble de fonctions métaboliques essentielles pour leur survie et leur prolifération. Le rôle du HIF est largement étudié dans les cas des microenvironnements hypoxiques notamment dans les tumeurs ou même lors de l'embryogenèse. Cependant, son rôle dans les réponses immunitaires contre les agents infectieux reste limité.

La première étude soulignant la présence du HIF était effectuée sur érythropoïèse induite par l'hypoxie dont le gène codant pour la protéine érythropoïétine humaine était identifié comme cible pour ces facteurs de transcription (Semenza et Wang, 1992).

Afin que HIF soit actif et effectue sa fonction biologique, une stabilisation du complexe de protéines hétérodimères est nécessaire. En effet, ce complexe se forme suite à la liaison entre une sous-unités  $\alpha$ , sensible à l'oxygène, de 120 kDa de poids moléculaire et composé de 826 acides aminés avec une sous-unité  $\beta$  de 94 kDa de poids moléculaire et composé de 789 acides aminés. Alors à date, on compte une seule sous-unité  $\beta$  et trois isoformes pour la sous unité  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ,-2 $\alpha$  et -3 $\alpha$ ) (Wang et Semenza, 1995). Les deux sous unité  $\alpha$  et  $\beta$  appartiennent à la famille de protéines en boucle d'hélice "basic helix-loop-helix (HLH)" et elles sont exprimés d'une

manière permanente. Cependant, dans un état de normoxie, elles sont dégradées par des enzymes spécifiques.

Différents mécanismes qui assurent l'altération du HIF-1 $\alpha$  dépendent directement de l'oxygène présent à un niveau normal. En effet, dans des conditions normales d'oxygène, HIF-1 $\alpha$  est hydrolysé par une des trois prolyl hydoxylases (PHD-1,-2, -3) qui vont hydroxyler au moins un des deux résidus proline. Ensuite, ces résidus sont ubiquitinés grâce à l'action de deux autres protéines, à savoir le domaine de ''von Hippel-Lindau (VHL)''ainsi qu'une ubiquitine ligase. Puis, HIF-1 $\alpha$  est dégradé dans des protéosomes (Fig. 6)

En outre, HIF-1 $\alpha$  peut-être inactivé par une enzyme appelé asparaginyl hydoxylase en bloquant la région c-terminale. De plus, plusieurs modifications post-traductionnelles comme la déacétylation par la sirtuin-1 (SIRT1) et SUMO-ylation (Small ubiquitin-like modifier) influencent la stabilité du HIF-1 $\alpha$  vers la dégradation protéosomale.

D'autres mécanismes qui empêchent la fonction du HIF-1 $\alpha$  ont été décrits. D'abord, des intermédiaires métaboliques du cycle de Krebs comme l'oxyde nitrique, le succinate et le fumarate ainsi que les ROS interfèrent avec l'action des PHD. Le stress oxydatif affecte également la fonction du HIF-1 $\alpha$  (Kaelin et al., 2008).

Ils existent des mécanismes à oxygène indépendant pour le processus d'altérations du HIF-1 $\alpha$  en état de normoxie. Par exemple, le récepteur pour la protéine kinase C activée (RACK1) en se liant à HIF-1 $\alpha$ , elle induit sa dégradation dans les protéosomes. Il existe aussi une autre voie assurée par l'autophagie médiée par des protéines chaperones (CMA) (Hubbi et al., 2013).

Sous hypoxie, les PHDs qui nécessitent l'oxygène et le Fe<sup>2+</sup> pour leur activité catalytique, sont inhibés, HIF-1 $\alpha$  échappe à la dégradation et s'accumule dans le cytoplasme et se trans-localise dans le noyau où il se lie à la sous unité  $\beta$ . Le facteur dimérique s'attache spécifiquement à une séquence d'éléments qui répondent à l'hypoxie (hypoxia response element HREs) sur les promoteurs des gènes cibles afin d'initier leur traduction. Durant cette étape le co-activateur transcriptionnel p300/Creb assure la stabilisation du HIF-1 $\alpha/\beta$ . Cette voie entraîne la transcription de plus de 1000 gènes cibles impliqués dans la fonction et le métabolisme des cellules (Wenger et al., 2005 ; Arany et al., 1996) (Fig. 6).



Figure 6 : Représentation schématique de la régulation du HIF-1α (A) en normoxie, (B) en hypoxie (Carroll et Ashcroft, 2005)

La production des ROS durant l'hypoxie permet la stimulation de la production du HIF-1 $\alpha$  à travers l'activation de la voie de mTOR. De plus, elle assure aussi sa stabilité par l'inhibition des hydrolases (Yuan et al., 2008).

La voie de HIF qui représente une voie de secours en état de stress, est impliquée dans plusieurs autres voies de régulations fonctionnelles et métaboliques. Elle peut évidemment activer le développement des cellules et des organes dans des conditions physiologiques normales ou suite à une tumeur ou autres problèmes pathologiques. Cependant, l'induction et la stabilisation du HIF-1 $\alpha$  en normoxie par d'autres médiateurs semblent plus intéressantes du point de vue immunologique. En effet, certaines cytokines pro-inflammatoires telles que TNF et l'interleukine-1 (IL-1 $\beta$ ) sont impliquées dans cette activation de HIF-1 $\alpha$  (Haddad, 2002 ; Jung et al., 2003). De plus, la reconnaissance des pathogènes par les cellules immunitaires peut activer la signalisation de la voie de MAPK (mitogen-activated protein kinase) par les TLRs (Toll like receptors). L'activation des TLRs permet l'induction de la signalisation du NF-<sub>k</sub>B qui induit à son tour la trans-activation et la stabilisation du HIF-1 $\alpha$  (Frede et al., 2006).

Contrairement au HIF-1 $\alpha$  qui est exprimé d'une manière permanente dans toutes les cellules immunitaires, HIF-2 $\alpha$  est détecté dans une minorité de cellules comme les macrophages associés aux tumeurs (TAMs) et les cellules T CD8. Cependant, leurs fonctions différents selon la population cellulaire (Imtiyaz et al., 2010 ; Doedens et al., 2013 ; Hubbi et al., 2015). En effet, il a été montré que HIF-1 $\alpha$  est impliqué dans l'inhibition de l'apoptose des neutrophiles dans des conditions hypoxique, alors que HIF-2 $\alpha$  ne semble jouer aucun rôle puisque il n'est pas exprimé dans cette lignée cellulaire (Hannah et al., 1995). En outre, la déplétion de HIF-1 $\alpha$  dans les macrophages entraine une réduction de leurs capacité migratoire et bactéricide (Cramer et al., 2003), cependant la déplétion de HIF-2 $\alpha$  leurs permet de garder une certaine activité migratoire et inflammatoire (Imtiyaz et al., 2010). De plus HIF-1 $\alpha$ , et non pas HIF-2 $\alpha$ , joue un rôle exclusive en terme de régulation et l'initiation de la glycolyse dans des cellules hypoxique (Hu et al., 2003). Finalement plusieurs études sur les tumeurs ont mis évidence ce rôle divergent entre HIF-1 $\alpha$  et HIF-2 $\alpha$ . Par exemple HIF-1 $\alpha$  promouvait le développement du cancer de colon alors que HIF-2 $\alpha$  représente un effecteur hypoxique prédominant pour l'élimination du cancer au niveau des cellules rénales (Kung et al., 2000 ; Kondo et al., 2002).

#### **2.** HIF-1α : Rôle et régulation dans les cellules du système immunitaire

La stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans le cytosol suivie par sa translocation vers le noyau suite à un manque d'oxygène, entraîne l'activation de plus de 1000 gènes cibles. En général, HIF-1 $\alpha$  induit l'expression dans tout type de cellules de l'organisme incluant les cellules du système immunitaire. Cependant, les gènes induits diffèrent d'une population cellulaire à l'autre selon les changements nécessaires face à un état d'hypoxie ou dans un microenvironnement inflammatoire. En outre, HIF-1 $\alpha$  cible deux grandes catégories de gènes, soit les gènes qui sont responsables de l'augmentation d'apport en oxygène ou ceux qui diminuent sa consommation. Ainsi, les cellules produisent leur énergie par l'intermédiaire d'une glycolyse accélérée accompagnée d'une réduction du métabolisme oxydatif. La stabilisation du HIF-1 $\alpha$  permet aussi la prolifération, le recrutement des cellules et l'angiogenèse (Lee et al., 2009)

#### a) Régulation métabolique

Suite à leur mission capitale qui consiste à éliminer les pathogènes, les cellules du système immunitaire, entretenues dans un microenvironnement inflammatoire, font face à un grand défi d'adaptation. L'activation, la migration et le maintien des fonctions effectrices de ces cellules nécessitent une demande accrue et rapide d'énergie sous forme d'ATP. Cela semble possible essentiellement grâce à un changement au niveau métabolique des cellules. Ce changement connu par l'effet de Warburg consiste à diminuer ou bloquer la phosphorylation oxydative en faveur d'une glycolyse intense et massive. L'équilibre bioénergétique de Warburg a été d'abord largement étudié dans le contexte de tumeurs, et il s'avère que les HIFs s'imposent comme des médiateurs clés pour la régulation de ce changement (Larbi et al., 2010). Par ailleurs, HIFs dirigent les changements métaboliques à travers la promotion de plusieurs protéines membranaires incluant les transporteurs de glucose (Gluts) (Zelzer et al., 1998), les transporteurs de monocarboxylate (MCTs) (Ullah et al., 2006) ainsi que les transporteurs des acides aminés (LAT1, xCT) (Elorza et al., 2012; Lu et al., 2015). Ces différents transporteurs assurent d'une part, le ravitaillement de diverses réactions d'anabolisme et de catabolisme et d'autre part, l'élimination des déchets ainsi que la régulation du pH. Sachant que l'accumulation de l'acide lactique résultant de la forte glycolyse entraîne l'altération du pH extra et intracellulaire (Parks et al., 2013).

La voie de HIF-1 $\alpha$  représente une pièce maîtresse qui coordonne l'équilibre entre les changements métaboliques et l'induction de l'activité immunitaire. Cette dernière nécessite un apport énergétique rapide et assez élevé. En effet, l'activation de cette voie entraîne une augmentation considérable de l'expression des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la glycolyse, permettant ainsi une accélération de ce processus (Nowicki et al., 2015). D'une façon plus détaillée, HIF-1 $\alpha$  induit directement une augmentation du niveau d'expression des transporteurs de glucose (Glut1 et Glut3) résultant en une meilleure absorption de glucose par les cellules (Starska et al., 2015). De plus, HIF-1 $\alpha$  cible aussi le gène codant pour la pyruvate déshydrogénase kinase-1 (PDK-1) qui inhibe à son tour, une enzyme clé, la pyruvate déshydrogénase (PDH) qui est responsable de la conversion du pyruvate en acetyl-CoA destiné à entrer dans le cycle de Krebs. Par conséquent, l'inhibition de la PDH par la PDK-1 déclenche une diminution de l'activité mitochondriale (Pappandreou et al., 2006).

HIF-1 $\alpha$  régule aussi le métabolisme des nucléotides. Ceci permet la modulation de l'environnement inflammatoire local. Par ailleurs, dans les tissus inflammés, les cellules apoptotiques et nécrotiques libèrent souvent de l'ATP et l'ADP dans le milieu extracellulaire (Eltzschig et al., 2006). Ces molécules, bien qu'elles peuvent induire la signalisation inflammatoire, leur métabolisme en adénosine entraîne aussi paradoxalement une atténuation des réponses inflammatoires (Eltzschig et al., 2014). L'adénosine en effet signalise à travers des récepteurs de protéine G dont particulièrement le récepteur A2A. Le gène codant pour ce récepteur figure parmi les cibles directes de HIF-1 $\alpha$  et son activation favorise des effets anti-inflammatoires (Odashima et al., 2005 ; Hasko et al., 2008).

#### b) HIF-1a dans les cellules T

Indépendamment du niveau d'oxygène dans les cellules ou dans les tissus inflammés, la régulation à la hausse de HIF-1 $\alpha$  dans les cellules T, suite à une activation antigénique, stimule différentes fonctions. En effet, l'hypoxie induit l'accumulation de l'adénosine extracellulaire qui active les récepteurs adénosine 2A (A<sub>2A</sub>R) et permet l'augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) intracellulaire. Cette signalisation entraîne une inhibition de la sécrétion des molécules pro-inflammatoires telles que IFN<sub>Y</sub>, TNF, IL-2 et ROS (Sitkovsky et al., 2004) et une augmentation dans la production de l'IL-10.

HIF-1α n'interfère pas avec le développement des cellules T (Caldwell et al., 2001). Cependant, l'activation du TCR (T cell receptor) lors d'amorçage des cellules T naïves, permet la stabilisation d'une isoforme 1.1 plus courte de HIF-1a. La régulation à la hausse de l'expression de HIF-1 $\alpha$  se passe à travers plusieurs voies mais celle de la phosphoinositol-3-kinase (PI3K)/mTOR est la plus étudiée (Nakamura et al, 2005). L'IL-6 et le TGF-β induisent aussi l'augmentation de la transcription de l'ARNm de HIF-1a à travers la voie de STAT3 (Kojima et al., 2002). De plus la stimulation des cellules T par l'IL-2 permet l'accumulation et la stabilisation du HIF-1α (Doedens et al., 2013). Les lymphocytes T cytotoxiques sont un outil principal pour combattre les pathogènes intracellulaires. En revanche, cette capacité cytotoxique induit une destruction massive des tissus dans lesquels les réponses immunitaires prennent lieu favorisant ainsi un micro-environnement hypoxique. L'activité cytotoxique est régulée entreautre, à travers les HIFs et le facteur VHL. En outre, il a été démontré chez la souris, suite à une infection chronique par le clone 13 du LCMV, que les CTL déficientes en VHL contrôlent efficacement la propagation virale (Deodens et al., 2013). Ce resultat, suggere que les HIFs est critique pour l'induction des facteurs de transcription nécessaires à l'acquisition de la fonction effectrice et aussi pour l'expression des récepteurs des molécules de co-stimulation; ce qui favorise l'élimination du virus (Deodens et al., 2013). Cepemdant dans un autre contexte, Ben-Shoshan et ses collaborateurs ont montré que HIF-1a affecte négativement les fonctions effectrices des cellules T CD4 et induit la prolifération des Tregs CD25<sup>+</sup> à travers la régulation du facteur de transcription Foxp3 (Ben-Shoshan et al., 2008). Enfin, il est plus clair à travers l'ensemble des travaux sur les cellules T, que la régulation du HIF-1 $\alpha$  se fait à plusieurs niveaux pour qu'il puisse jouer différents rôles qui dépendent généralement du microenvironnement.

#### c) HIF-1a dans les cellules myéloïdes

Les cellules myéloïdes sont essentielles pour les réponses innées. Généralement, elles exercent leurs fonctions effectrices microbicides dans des environnements hostiles comme les tissus inflammés caractérisés par un manque d'oxygène et de glucose avec un pH relativement bas. Ainsi, comparés aux cellules T, elles présentent un métabolisme anaérobique assez efficace malgré un nombre réduit de mitochondries.

Sous un état d'hypoxie, les neutrophiles murins démontrent une régulation à la hausse du niveau d'expression de HIF-1 $\alpha$  qui intensifie à son tour plusieurs fonctions pro-inflammatoires ainsi

que l'augmentation de la production des peptides antibactériens. De plus, dans ces conditions, d'autres fonctions telles que la phagocytose et la chimiotaxie semble préservées (Walmsley et al., 2005). En outre, HIF-1 $\alpha$  semble essentiel pour l'élimination de *Pseudomonas aeruginosa* et l'induction de l'apoptose pour les PMN (Berger et al., 2013). En revanche, récemment il a été démontré qu'à la suite d'une infection par *Staphylococcus aureus*, les neutrophiles perdent leur capacité à tuer le pathogène à cause de l'altération de la production des ROS, résultant en une destruction significative du tissu (Mc Govern et al., 2011).

Les macrophages et les monocytes jouent un rôle essentiel aussi bien dans l'homéostasie que dans l'immunité. Les voies de HIFs sont primordiales pour ces cellules et malgré la similitude structurale entre HIF-2 $\alpha$  et HIF-1 $\alpha$ , ce dernier est largement exprimé et régulé à la hausse plus rapidement que le premier comme dans le cas d'une stimulation des macrophages par LPS. En effet, des travaux effectués sur des souris déficientes en HIF dans la lignée des myéloïdes, ont montré une diminution significative du niveau de l'expression des intermédiaires de la glycolyse résultant en une réduction dramatique des fonctions liées à cette voie. Alors que la déplétion du facteur VHL permet la stabilisation des HIFs dans les macrophages résultant en une augmentation du niveau de production de l'énergie, accompagnée d'une accumulation de lactate (Fang et al., 2009). Habituellement, HIF assure une prolongation dans la durée de vie et améliore la migration de ces cellules vers le site d'infection en induisant respectivement l'expression de Cdc42 et Rac1 pour les macrophages et l'integrine  $\beta$ 2 pour les neutrophiles (Zhou et al., 2009). Cependant, dans un contexte du cancer du sein, une autres étude a montré que la régulation à la hausse du niveau de l'expression de HIF-1 $\alpha$  associée à une surexpression des facteurs d'inhibition de la migration (Egners et al., 2016).

Quant aux fonctions des macrophages, HIF-1 $\alpha$  régule la production des cytokines proinflammatoires incluant le TNF, l'IL-1 $\beta$  et le VGEF (Peyssonnaux et al., 2005). HIF-2 $\alpha$  peut également moduler cette capacité puisque des cellules déficientes en ce facteur semblent incapables de produire l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-12 suite à une activation combinée par le LPS et l'IFN<sub>Y</sub> (Imtiyaz et al., 2010). En outre, une étude intéressante a montré que l'expression de HIF-1 $\alpha$  dans les cellules phagocytaires affecte leur profil inflammatoire intrinsèque ce qui conduit à des lésions d'athérosclérose (Aarup et al., 2016). Les macrophages sont des cellules phagocytaires capables de tuer les pathogènes intracellulaires une fois phagocytés. Un exemple détaillé montre que les macrophages tuent les bactéries plus efficacement sous hypoxie. De plus les, voies qui assurent la production du TNF et du NO dépendent directement de HIF-1 $\alpha$ (Peyssnnaux et al., 2005). Ainsi, il a été démontré que la déplétion ciblé de HIF-1 $\alpha$  dans la lignée des myéloïdes cause une émergence précoce de granulomes nécrotiques ce qui affaiblit la résistance contre l'agent infectieux *Mycobacterium avium* (Cardoso et al., 2015).

Récemment, des études ont révélé que l'expression de HIF semble également être un facteur déterminant pour la différenciation des monocytes et la polarisation des macrophages. En effet, suite à une stimulation par le LPS et l'IFN<sub>Y</sub>, HIF-1 $\alpha$  est largement transcrit durant la polarisation des macrophages vers un phénotype M1 alors que HIF-2 $\alpha$  est plutôt induit durant la polarisation vers un phénotype M2. Cet effet de HIF-1 $\alpha$  peut être attribué à son rôle critique dans l'induction de iNOS sous hypoxie (Takeda et al., 2010). Cependant, dans les tumeurs, HIF-1 $\alpha$  induit une activation non classique des TAMs et entraîne leur polarisation vers un phénotype M2 (Colegio et al., 2014). De plus, dans un micro-environnement cancéreux, l'hypoxie déclenche une régulation à la hausse rapide et sélective de PD-L1 dans les MDSC (myeloid-derived suppressor cells) de la rate. L'augmentation de l'expression de PD-L1 a été démontrée comme dépendante de HIF-1 $\alpha$ , alors que son blocage entraîne une amélioration de l'activation des cellules T, accompagnée d'une diminution de la production de l'IL-6 et L'IL-10 par les MDSC (Noman et al., 2014).

#### d) HIF-1a dans les cellules dendritiques

Les DCs sont des cellules spécialisées dans la présentation d'Ag. Elles sont dotées d'un rôle capital dans l'harmonisation à l'interface de l'immunité innée et adaptative. Cette mission leurs permet de coordonner des réponses dirigées contre les pathogènes dans des microenvironnements souvent caractérisés par un manque d'oxygène. Bien que plusieurs études ont essayé de révéler l'importance de HIF-1 $\alpha$  pour la survie, la maturation ainsi que le fonctionnement de ces cellules, les résultats semblent controversées aussi bien chez l'Homme que dans le modèle murin, mais en même temps, elles ont confirmé que HIF-1 $\alpha$  représente une pièce maîtresse dans l'ensemble des fonction des DCs. HIF-1 $\alpha$  peut-être induit à l'expression et stabilisé non seulement sous hypoxie mais aussi en normoxie suite à une stimulation endogène ou exogène comme celle initiée par les TLRs (TLR2 et TLR4) (Spirig et al., 2010). Les premiers travaux effectués sur les DCs dérivées des monocytes humains *in vitro*, ont déduit que la présence d'une quantité suffisante d'oxygène est nécessaire pour la différenciation et la maturation complète de ces cellules (Mancino et al., 2008). Les mêmes résultats ont aussi été constatés en utilisant des DCs murines où la déplétion de HIF-1α est néfaste pour leur maturation ce qui entraîne une inhibition de leur capacité à stimuler les cellules T (Jantsch et al., 2008). En effet, l'hypoxie inhibe l'expression de plusieurs marqueurs de différentiation et de co-stimulation tels que CD1a, CD40, CD80, CD86, CMH-I et CMH-II lors d'une stimulation par LPS (Mancino et al., 2008).

HIF-1 $\alpha$  affecte également la survie des DCs puisque la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  a été associée à la régulation à la baisse de l'expression de la molécule anti-apoptotique Bcl-2 en faveur de l'amélioration de l'activité de caspase3 (Naldini et al.,2012). En outre, la mort cellulaire est réduite dans les DCs hypoxiques maturées en présence de LPS. Alors, l'inhibition de la voie de PI3K/AKT par entre-autres BCL2, déclenche l'exténuation de ces cellules (Naldini et al.,2012). De plus, il a été décrit que les DCs hypoxiques matures diminuent leur capacité phagocytaire par rapport aux cellules matures normoxiques (Yang et al., 2009).

Les DCs fournissent aussi le troisième signal nécessaire pour la différenciation et l'amorçage des cellules T. Ainsi, la production des cytokines représente une composante critique pour définir la nature de la réponse initiée. En effet, Mancino et ses collaborateurs ont démontré que l'hypoxie améliore la production des cytokines pro-inflammatoires par les DCs dérivées des monocytes humains *in vitro*, particulièrement le TNF et l'IL-1 $\beta$  (Mancino et al., 2008). Pareillement, Kohler et son équipe ont révélé, suite à l'utilisation des DCs murines, que l'hypoxie améliore l'expression des cytokines pro-inflammatoires comme l'IL6 et l'IL-12 (Kohler et al., 2012). La production de ces cytokines est influencée par le milieu extracellulaire. En outre, les DCs hypoxiques matures expriment majoritairement des récepteurs d'adénosine A<sub>2</sub>b d'une manière dépendante de HIF-1 $\alpha$ . L'activation de ce récepteur permet par exemple, une augmentation du niveau de l'IL-12p70 et le TNF ainsi qu'une amélioration du niveau de l'IFN<sub>Y</sub>, essentiel pour la différentiions des Th1. En détail, la production de l'IL-12p70 est associée à une accumulation de la AMPc intracellulaire (Yang et al., 2010). De plus, la présence de la protéine de HIF-1 $\alpha$  semble nécessaire pour une production adéquate de l'interféron de type-I, soit IFN $\alpha$  et IFN $\beta$  (Wobben et al., 2013).

Ensuite, l'hypoxie affecte aussi la migration des DCs. Dans cette condition, le récepteur de chimiokine CCR7, responsable de l'expédition des DCs vers les ganglions lymphatiques, est régulé à la baisse dépendamment de HIF-1 $\alpha$  (Mancino et al., 2008). En effet, l'injection des DCs hypoxiques dans les pattes des souris, montre une altération de la migration de ces cellules vers les ganglions. En revanche, le recrutement des leucocytes sur le site de l'injection est amélioré (Mancino et al., 2008).

Finalement, HIF-1 $\alpha$  régule négativement le développement des DCs plasmocytoides aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Weigert et al., 2012). Dans un micro-environnement caractérisé par une forte inflammation comme dans le cas de colites, ce facteur induit la cytokine anti-inflammatoire IL-10 ainsi que la prolifération des Tregs en activant la transcription du facteur Foxp3 ce qui permet de moduler l'hyper-inflammation intestinale (Clambey et al., 2012).

#### 3. HIF-1a dans les différents modèles d'infection

Outre l'hypoxie et l'inflammation, divers pathogènes peuvent induire directement la surexpression et la stabilisation du HIF-1 $\alpha$  dans les cellules immunitaires. Cependant, les conséquences engendrées diffèrent d'un pathogène à l'autre et dépendent de la population de cellules immunitaires impliquées.

#### a) Les infections bactériennes

HIF-1 $\alpha$  joue un rôle critique dans les réponses innées contre les infections bactériennes. Les premiers travaux menés sur le modèle d'infection par les *Streptococcus* de groupe B ont démontré que la stabilisation du HIF-1 $\alpha$  est essentielle pour l'infiltration et l'activation des cellules myéloïdes *in vivo*. Ainsi, la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  confère aux macrophages une élimination plus efficace des organismes pathogènes intracellulaires. Par ailleurs, une déplétion spécifique du HIF-1 $\alpha$  dans les lignées myéloïdes chez la souris altère la mobilité et l'invasion des macrophages sans affecter leurs capacité de produire le TNF et l'oxyde nitrique (Cramer et al., 2003).

Par la suite, plusieurs autres travaux plus récents ont confirmé le rôle déterminant de HIF-1 $\alpha$  dans l'élimination des bactéries par les cellules myéloïdes. Par exemple, les souris spécifiquement déficientes en HIF-1 $\alpha$  dans la lignée myéloïde, présentent des difficultés pour contrôler et résoudre une infection causée par *Mycobacterium* ce qui engendre une nécrose émergente précoce dans les granulomes qui éliminent l'agent pathogène (Cardoso et al., 2015). De plus, lors d'une infection par *Pseudomonas aeroginosa*, HIF-1 $\alpha$  favorise et orchestre les fonctions effectrices des neutrophiles, dans lesquels il est nécessaire, pour la production des peptides antimicrobiens essentiels pour lutter contre l'agent pathogène *in vivo* (Berger et al., 2013). Dans un autre modèle d'infection *in vitro* par *Helicobacter pylori*, la stabilisation du HIF-1 $\alpha$  dans les macrophages induit principalement les gènes codant pour les molécules inflammatoires telles que l'IL-6, IL-1 $\beta$  et iNOS. Cependant, cette induction n'affecte pas la charge bactérienne une fois évaluée *in vivo* dans des souris déficientes en HIF-1 $\alpha$  dans les cellules myéloïdes. Par ailleurs, l'absence de HIF-1 $\alpha$  dans ces souris entraîne une forte inflammation qui accentue la gastrite (Matak et al., 2015).

Donc, à travers l'ensemble de ces travaux on remarque que HIF-1 $\alpha$  est plutôt favorable pour la défense de l'hôte et essentiel pour l'élimination des bactéries. En revanche, quelques bactéries ont développé des mécanismes afin de le bloquer comme *Bacillus anthracis*, qui inhibe les intermédiaires eIF4B et eF4E nécessaires pour la traduction du HIF-1 $\alpha$  via sa toxine de l'anthrax létal. En effet, la toxine bloque la voie MKK1/2 – ERK1/2 (Ouyang, et al., 2014).

#### **b)** Infections virales

La stabilisation de HIF-1 $\alpha$  est bien observée suite à des infections virales. En revanche, et contrairement aux infections bactériennes, la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  durant certaines infections virales aigües, semble nuisible à l'hôte. En effet, il a été récemment démontré que le virus de *Vaccinia* induit HIF-1 $\alpha$  par l'inhibition de la PHD2 à travers la protéine virale C6, résultant en une reprogrammation métabolique des cellules infectées afin d'augmenter la synthèse des précurseurs métaboliques utilisés pour la réplication du virus (Mazzon et al., 2015). Le virus syncytial respiratoire provoque aussi l'expression de HIF-1 $\alpha$  dans les cellules épithéliales dépendamment de la voie de l'oxyde nitrique (Kilani et al., 2004). Cependant, chez les souris infectées par le VSV (Vesicular stomatitis virus), un niveau réduit de HIF-1 $\alpha$  confère aux cellules une résistance contre l'invasion et la réplication virale en augmentant la sécrétion de l'IFN $\beta$  et l'expression d'autres gènes anti-viraux (Hwang et al., 2006).

Certaines infections virales chroniques induisent aussi HIF-1 $\alpha$  ce qui limite l'élimination du virus accompagnée par une augmentation de la production du VEGF (vascular endothelial growth) et d'autres facteurs pro-angiogéniques qui contribuent à l'oncogenèse. En effet, la stabilisation du HIF-1 $\alpha$  est étroitement liée au potentiel oncogénique du virus de l'Hépatite B (HBV). Par ailleurs, la protéine oncogénique x (HBx) interagit directement avec HIF-1 $\alpha$  afin de bloquer son interaction avec le peptide de VHL et éviter sa dégradation par les protéosomes (Moon et al., 2004). L'infection par le virus de l'Hépatite C (HCV) stabilise aussi la protéine du HIF-1 $\alpha$  à travers la signalisation du NF-kB et MAPK.

En outre, il a été démontré que l'activation ou la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ , durant des infections virales chroniques par le virus de Papilloma type 16 (HPV-16) ou le virus de la leucémie des cellules T de type1 (HTLV1) ou le virus d'Epstein-Barr (EBV), sont associées avec des transformations néoplasiques (Birner et al., 2000 ; Tomita et al., 2007 ; Wakisaka et al., 2004).

HIF-1α interagit également directement avec les gènes viraux, comme ceux du HIV ou du JCV afin d'influencer l'activation des gènes cibles de l'hôte à travers les HREs.

#### c) Infections parasitaires

Contrairement aux infections bactériennes et certaines infections virales, l'implication de HIF-1 $\alpha$  est en faveur de l'agent pathogène et affecte négativement l'hôte. En effet, plusieurs parasites comme *Plasmodium berghei*, *Plasmodium yoelii* et *Plasmodium falciparum* se développent et survivent mieux dans des conditions hypoxiques. En outre, la stabilisation du HIF-1 $\alpha$  par des activateur tels que le chlorure de cobalt ou le di-méthyl-oxalyl-glycine entraîne une amélioration de l'infection par *P. berghei* (Ng et al., 2014).

*Toxoplasma gondii*, qui est un parasite intracellulaire, nécessite autant HIF-1 $\alpha$  pour sa réplication et sa survie à l'intérieur des cellules de l'hôte. Par ailleurs, la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  à travers l'inhibition du PHD2, permet la transcription de l'hexokinase 2 (HK2) afin d'augmenter le flux de la glycolyse dans les cellules infectées (Menendez et al., 2015). Le parasite de *Theileria annulata* se sert de HIF-1 $\alpha$  dans les macrophages et les monocytes infectés afin de limiter la production du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et éviter l'augmentation des métabolismes oxydatifs défavorables à sa survie (Metheni et al., 2014 ; Metheni et al., 2015 ).

Les mécanismes de stabilisation de HIF-1 $\alpha$  par les parasites, entre autres *Leishmania*, pour leurs avantages, sont très intéressants du point de vue immunologique, car ils touchent les cellules ainsi que le micro-environnement et influencent directement les réponses immunitaires engendrées.

#### 4. HIF-1α et *Leishmania*

L'infection par le parasite *Leishmania* est souvent accompagnée par une forte inflammation. C'est un état physiologique demandant une augmentation spectaculaire de la vascularisation du tissu infecté et du métabolisme cellulaire. Cependant, cette forte inflammation induit la destruction tissulaire causée principalement par une sécrétion massive de la cytokine proinflammatoire TNF. L'ensemble de ces changements indique bien l'installation d'un microenvironnement hypoxique dans le site d'infection. En effet, dans la LC chez des souris BALB/c infectées par *L. amazonensis*, des coupes de tissus révélées par immuno-histochimie montrent une forte stabilisation et une accumulation de HIF-1 $\alpha$  aussi bien dans le cytoplasme et autour des parasites dans les vacuoles parasitophores des macrophages infectés.

Durant l'infection, HIF-1 $\alpha$  est stabilisé non seulement par le micro-environnement hypoxique, mais aussi par le parasite lui-même. Par ailleurs, des travaux récents effectués *in vitro* sur le modèle humain et murin démontrent la capacité des cellules mononucléaires et des DCs à stabiliser HIF-1 $\alpha$  suite à une infection par les promastigotes de *L. donovani* et *L. amazonensis*. Le mécanisme adopté par le parasite consiste à diminuer ou même neutraliser les molécules de fer Fe<sup>2+</sup> dans le cytoplasme qui sont des cofacteurs nécessaires pour le fonctionnement des PHD ce qui entraîne leur inhibition. En effet, Degrossoli et ses collaborateurs ont montré que l'utilisation d'un traitement qui vise l'inhibition de HIF-1 $\alpha$  dans des macrophages infectés par *L. amazonensis* résulte en une diminution importante de la survie des parasites (Degrossoli et al., 2011). Des résultats similaires ont aussi été obtenus *in vitro* avec les promastigotes de *L. donovani*, montrant le rôle fondamental de HIF-1 $\alpha$  dans le développement du parasite intracellulaire (Singh et al., 2012).

La nécessité de stabilisation de HIF-1 $\alpha$  par les promastigotes de *Leishmania* afin d'assurer leur survie dans les macrophages n'est pas complètement claire. Cependant, plusieurs études ont défini une implication de HIF-1 $\alpha$  dans la régulation de l'expression de la variation allélique de la chaîne de transport de fer SLC11A1/NRAMP1 par la liaison directe des microsatellites lors de l'activation des macrophages, suite à une infection ou une forte inflammation. En outre, le locus Ity/Lsh/Bcg codant pour la protéine SLC11A1/NRAMP1, régule plusieurs éléments impliqués dans la résistance des macrophages tels que les chimiokines CXC, l'IL-1 $\beta$ , iNOS, MHC II, TNF, NO ainsi que la voie de la L-arginine et l'activité microbicide (Blackwell et al., 2000 ;Vidal et al., 1995). De façon intéressante, la déplétion de HIF-1 $\alpha$  dans les macrophages murins diminue l'expression du gène *Slc11a1* et limite les réponses contre le parasite intracellulaire.

# IV. Délimitation du sujet de recherche

La LV représente la forme la plus sévère des leishmanioses et la maladie demeure fatale en absence de traitement. *Leishmania donovani* est une des deux espèces de *Leishmania* causant cette maladie. Ce parasite est strictement intracellulaire et cible principalement les macrophages de l'hôte. Bien que la maladie soit auto-curable dans le foie, le parasite établit une infection chronique dans la rate et dans la moelle osseuse des souris de souche C57/BL6. En effet, suite à une infection le parasite engendre une forte inflammation accompagnée d'une splénomégalie qui consiste en un massif recrutement des cellules immunitaires entre autres; les cellules myéloïdes et les cellules T.

Dans ce projet, on s'intéresse au modèle expérimental murin de la LV. En effet, l'infection dans la rate se manifeste en deux stades : d'abord, la phase aigüe caractérisée par une faible charge parasitaire, ensuite une phase chronique qui s'installe environ trois semaines post-infection et qui est caractérisée par une expansion dramatique de la charge parasitaire accompagnée d'une destruction massive de la micro-architecture de la rate. Le développement intensif du parasite durant cette phase est accompagné par l'immunosuppression. Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que le TNF est responsable de la destruction de la zone marginale de la rate. De plus durant cette phase chronique, les DCs et les cellules T naïves perdent leur capacité de migration vers la zone de cellules T afin d'amorcer les réponses spécifiques (Engwarda et al., 2004 ; Ato et al., 2002).

La forte inflammation semble jouer un rôle clé dans le remodelage des réponses immunitaires lors de l'infection. Dans le cas de la LV, les réponses inflammatoires telles que la production de TNF ou l'IL-6 sont régulées par IRF-5 qui signalise à travers la voie du MyD88. IRF-5 est activé soit à travers le TLR-7 ou TLR-9, soit directement par l'interféron de type I ou par un agent pathogène comme dans le cas de quelques infections virales. Par ailleurs, les souris *Irf-5<sup>-/-</sup>* infectées par *L. donovani* montrent une augmentation limitée de la taille de la rate conséquence d'une inflammation réduite (Paun et al., 2011).

Durant la phase aigüe de la LV, les réponses des cellules T CD8 sont primordiales pour le contrôle de la charge parasitaire. Dans ce contexte, divers travaux ont élucidé le rôle de l'inflammation dans la régulation de ces réponses. En effet, la cytokine inflammatoire IL-12 est

essentielle pour l'amorçage et l'acquisition des fonctions effectrices des cellules T CD8 dans plusieurs modèles d'infection aigüe comme celle par *Listeria monocytogenes*, le virus de *Vaccinia* et *Toxoplasma gondii* (Ohteki et al, 1999; Xiao et al, 2009; Wilson et al, 2010). De plus, un amorçage efficace des cellules T CD8 nécessite aussi la présence de l'interféron de type I et II (IFN<sub> $\alpha/\beta$ </sub>et IFN<sub>Y</sub>) qui sont deux cytokines inflammatoires. Ensuite récemment, Richer et ses collaborateurs ont démontré que le milieu inflammatoire contrôle la sensibilité antigénique des cellules T CD8 à travers l'amélioration de la signalisation de leurs TCR (Richer et al., 2013). Cependant, dans un environnement inflammatoire chronique, les cellules T CD8 sont affectées négativement et elles présentent une altération dans la production des réponses mémoires (Stelekati et al, 2014).

L'étude des réponses spécifiques des cellules T de la LV, dans un modèle murin, semble assez compliquée vu le manque d'identification d'Ag spécifique pour le parasite L. donovani. Afin de surmonter ce handicap, précédemment dans notre laboratoire, nous avons utilisé un parasite transgénique appelé PINK. Ce parasite exprime l'Ag de l'ovalbumine sur sa surface membranaire. Afin d'étudier les réponses spécifiques des cellules T CD8, nous avons utilisé une approche expérimentale qui consiste à transférer adoptivement des cellules T CD8 OT-I congéniques CD45.1 dans des souris sauvages C57/BL6 CD45.2 un jour avant l'infection par PINK afin de rejoindre la rate. Les résultats obtenus montrent une expansion limitée des cellules T OT-I CD8 avec un pic à environ sept jours post-infection. Des analyses plus approfondies ont montré que seulement 0.1% à 0.2% des cellules T sont spécifiques pour l'Ag alors que dans d'autres modèles, cette fréquence peut atteindre 10% comme le cas du virus de Vaccinia recombinant. De plus, seulement 10% des cellules OT-I sont des cellules effectrices de courte durée de vie (SLEC), alors que la fréquence de cellule effectrice précurseur de mémoire (MPEC) est de l'ordre de 40%. Les cellules sont polyfonctionnelles produisant plus qu'une seule cytokine à savoir l'IL-2, TNF et IFN<sub>Y</sub> (Joshi et al., 2009). Ensuite, la cinétique montre une légère contraction des cellules vers le jour 14 post infection. Elles sont à 80% de phénotype de mémoire centrale (Tcm). Durant la phase chronique les cellules T OT-I se réactivent et présente un profil d'épuisement suite à la surexpression du PD1 et finissent par mourir. Alors que les cellules T CD4 commencent à être amorcées par les DCs (Joshi et al., 2009).

Le blocage des molécules d'inhibition, comme LAG-3, H7-B1 et TGF $\beta$  pour les cellules T CD8, n'engendre pas la restauration de l'expansion de ces cellules. En revanche, le blocage de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 le permet. Les tissus infectés et endommagés par la forte inflammation pourraient être en état d'hypoxie. Cet état induit la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  qui représente un facteur clé pour l'adaptation et la survie des cellules du système immunitaire. HIF-1 $\alpha$  est impliqué dans la régulation de plusieurs voies mais aussi dernièrement, des études en oncologie lui ont attribué un rôle immunosuppresseur.

De ce fait, divers travaux ont montré le rôle joué par HIF-1 $\alpha$  dans l'expression de l'IL-10. En effet, dans le cas de l'athérosclérose, HIF-1 $\alpha$  atténue l'inflammation par la modulation de l'activité des cellules T qui vont réguler à la baisse la production de l'IFN<sub>Y</sub> en faveur de la sécrétion de l'IL-10 (Ben Shoshan J et al., 2009).

Les DCs sont responsables de l'amorçage des cellules T CD8 et CD4. Le milieu inflammatoire influence aussi la fonction des DCs. En effet, il a été démontré dans l'ischémie, que les DCs différenciées sous hypoxie sur-expriment HIF-1 $\alpha$  qui déclenche à son tour une sécrétion élevée de l'IL-10.

En résumé, deux objectifs ont été élaborés pour cette thèse :

- i) Le premier objectif de ce travail consiste à déterminer le rôle du microenvironnement inflammatoire et HIF-1 $\alpha$  dans les DCs conventionnelles CD11c<sup>+</sup> durant la phase aigüe de l'infection ainsi que son implication dans la modulation des fonctions des cellules T CD8
- ii) Le deuxième objectif consiste à déterminer le rôle de HIF-1α pendant la phase chronique de le LV dans les lignées myéloïdes et spécifiquement sur les DCs, les monocytes et les macrophages aussi bien dans la rate que dans la moelle osseuse qui représente l'origine de genèse de ces cellules. De plus, nous tenterons de comprendre la façon par laquelle les réponses myéloïdes influencent les réponses de Th1 dans un microenvironnement inflammatoire chronique établi par le parasite de *L. donovani*.

# **Chapitre 1**

# IRF-5-mediated inflammation limits CD8<sup>+</sup> T cell expansion by inducing HIF-1α and impairing dendritic cell functions during *Leishmania* infection

#### Résumé

La réponse des cellules T CD8 nécessite le déclenchement d'un processus inflammatoire. Cette inflammation semble essentielle pour l'amorçage, le façonnage et le maintien de cette réponse. L'infection par le parasite de Leishmania donovani induit une inflammation qui est initiée par l'activation du facteur de transcription IRF-5. Ce facteur est responsable de la transcription de plusieurs gènes codant pour des cytokines inflammatoires tels que l'IL-6 et le TNF. Dans cette étude, nous explorons le rôle de l'inflammation induite par IRF-5 dans la régulation de la réponse des cellules T spécifique pour l'antigène durant la phase aigüe de l'infection. Nos résultats indiquent que la réponse inflammatoire initiés par IRF-5 limite l'expansion des cellules T CD8 et induit le facteur de HIF-1 $\alpha$  dans les cellules dendritiques. La déplétion de HIF-1 $\alpha$  dans la population exprimant CD11c promouvait une élévation de l'expansion des cellules T CD8 ainsi qu'une augmentation de la fréquence des cellules effectrices (SLEC). L'amélioration de la réponse des cellules T CD8 qui résulte essentiellement d'une augmentation au niveau de l'expression de la cytokine inflammatoire IL-12 dans les cellules dendritiques, entraine une diminution significative de la charge parasitaire dans la rate. Ce mécanisme nous permet de conclure que l'activation de HIF-1 $\alpha$  dans les DCs représente un moyen adopté par le parasite afin de contourné la réponse immunitaire spécifique.

# IRF-5-mediated inflammation limits CD8<sup>+</sup> T cell expansion by inducing HIF-1α and impairing dendritic cell functions during *Leishmania* infection

#### Akil Hammami, Tania Charpentier, Mélina Smans, and Simona Stäger

INRS - Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval (QC), H7V 1B7, Canada

Running title: Hif-1a impairs DC function during infection

Address correspondence to:	Simona Stäger
	INRS – Institut Armand-Frappier
	531, Boulevard des Prairies
	Laval, QC H7V 1B7
	Canada
	Phone: +1- 450-687-5010, ext. 4403
	Fax: +1- 450-686-5501

simona.stager@iaf.inrs.ca

#### Abstract

Inflammation is known to be necessary for promoting, sustaining, and tuning CD8<sup>+</sup> T cell responses. Following experimental *Leishmani donovani* infection, the inflammatory response is mainly induced by the transcription factor IRF-5. IRF-5 is responsible for the activation of several genes encoding key pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF. Here, we investigate the role of IRF-5-mediated inflammation in regulating antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell responses during *L. donovani* infection. Our data demonstrate that the inflammatory response induced by IRF-5 limits CD8<sup>+</sup> T cell expansion and induces HIF-1 $\alpha$  in dendritic cells. Ablation of HIF-1 $\alpha$  in CD11c<sup>+</sup> cells resulted into a higher frequency of short-lived effector cells (SLEC), enhanced CD8<sup>+</sup> T cell expansion, and increased IL-12 expression by splenic DCs. Moreover, mice with a targeted depletion of HIF-1 $\alpha$  in CD11c<sup>+</sup> cells had a significantly lower splenic parasite burden, suggesting that induction of HIF-1 $\alpha$  may represent an immune evasive mechanism adopted by *Leishmania* parasites to establish persistent infections.
# **Author summary**

Inflammation is essential for inducing, sustaining, and regulating  $CD8^+$  T cell responses. The transcription factor IRF-5 is mainly responsible for initiating the inflammatory response following experimental *Leishmani donovani* infection. IRF-5 is activates several genes encoding key pro-inflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF. In this study, we investigate the role of IRF-5-mediated inflammation in regulating antigen-specific  $CD8^+$  T cell responses during *L. donovani* infection. Our data demonstrate that the inflammatory response induced by IRF-5 limits the expansion  $CD8^+$  T cell. This negative effect is mediated by the induction of HIF-1a in dendritic cells. Indeed, we observed a significant increase in  $CD8^+$  T cell expansion in mice lacking HIF-1a expression in dendritic cells. Moreover, these mice had a significantly lower parasite burden in the spleen, suggesting that induction of HIF-1a may represent an immune evasive mechanism adopted by *Leishmania* parasites to establish persistent infections.

# Introduction

Maintenance of a proper balance between inflammatory and anti-inflammatory responses is essential for achieving effective immunity against infectious pathogens while limiting collateral inflammatory damage to the tissue. However, immunosuppressive responses are sometimes generated in excess. This event often results in the strong inhibition of protective pro-inflammatory responses and leads to susceptibility to infectious pathogens, such as *Plasmodium*[1,2], *Leishmania*[3,4], lymphocytic choriomeningitis virus [5,6], and *Mycobacteria spp*.[7].

Visceral leishmaniasis (VL) is a good example of a dysregulated balance between inflammatory and anti-inflammatory responses. VL is a potentially lethal disease caused by *Leishmania donovani* and *L. infantum/chagasi. Leishmania* are protozoan parasites, existing as flagellated promastigotes within sandflies and as intracellular amastigotes in infected mammals. In the host, *Leishmania* preferentially infects macrophages; however, it can also be found in other cells, such as DCs, neutrophils, and fibroblasts [8-12].VL is characterized by persistent infection of the spleen and by immunodeficiency during the chronic stage [13]. Experimental infection with *L. donovani* results in pathogen-induced disruption of the splenic microarchitecture, which involves both the disruption of the marginal zone and the B-cell follicles, and the progressive loss of stromal cells [14,15]. This disruption is mediated by TNF [16], a cytokine that is overexpressed during VL [17,18]. Interestingly, TNF deficient mice infected with *L. donovani* have a lower IL-10 mRNA accumulation in the spleen than do their wild type counterparts [14], suggesting that TNF may be involved as a positive regulator of IL-10 production. We have recently demonstrated that the inflammatory response following *L. donovani* infection is largely mediated by the transcription factor IRF5 [19]. IRF5 can be activated by TLR7 and TLR9 via the MyD88 signaling pathway and/or directly by viral infections and Type I interferon [20]. This transcription factor is responsible for the activation of genes encoding for various key inflammatory cytokines [21-24]. Interestingly, *L. donovani* infected *Irf5<sup>-/-</sup>*mice do not show the hallmark symptoms of VL, which are hepato-and splenomegaly, due to the lack of inflammatory cell infiltration. Furthermore, these mice generateprofoundly defective Th1 responses during chronic disease [19]. The role of IRF-5-mediated inflammation on the development of CD8<sup>+</sup> T cell responses during VL has not yet been explored.

We have previously shown that *L. donovani* induces defective  $CD8^+$  T cell responses with limited clonal expansion [25]. Moreover, the majority of  $CD8^+$  T cells that survive clonal contraction are central memory-like cells, suggesting that perhaps effector responses are not sustained.

Pro-inflammatory cytokines are known to tune  $CD8^+$  T cell responses and provide the critical third signal necessary for the development of effector  $CD8^+$  T cells [26-30]. For instance, IL-12 seems to regulate T-bet and eomesodermin (Eomes) expression [30,31], the differentiation of short-lived effector cells (SLEC) [30], and the cytolytic activity of CTLs [32]. Type I IFN, IFN $\gamma$ , and IL-4 also appear to be required for efficient  $CD8^+$  T cells priming and memory differentiation [33-38]. The inflammatory milieu was also shown to control antigen sensitivity by enhancing T cell receptor signaling [39]. In contrast, Stelekati et al. recently reported that a bystander chronic inflammatory milieu impairs the development of  $CD8^+$  T cell memory following immunization [40]. This implies that inflammation does not always play a positive role

in supporting the development of CD8<sup>+</sup> T cell responses and that the role of inflammation might depend on the specific inflammatory milieu induced by each pathogen.

In this study, we investigated the role of IRF-5 mediated inflammation in regulating CD8<sup>+</sup> T cell expansion following *L. donovani* infection. Our data shows that IRF5 participates in limiting antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cell expansion at the very early stages of infection by indirectly inducing HIF-1 $\alpha$  expression in DCs. Upregulation of HIF-1 $\alpha$  in DCs resulted in decreased IL-12 and increased IL-10 expression. Ablation of HIF-1 $\alpha$  in CD11c<sup>+</sup> cells led to a higher frequency of short-lived effector CD8<sup>+</sup> T cells (SLEC), enhanced CD8<sup>+</sup> T cell expansion, and significantly reduced parasite burden.

### Results

# 1. IRF-5-mediated inflammation limits CD8<sup>+</sup> T cell expansion during acute infection We have previously demonstrated that IRF5 is essential for initiating the inflammatory response following experimental L. donovani infection. Indeed, Irf5<sup>-/-</sup> mice fail to generate mature granulomas in the liver and exhibit a severely reduced inflammatory infiltration in the liver and spleen [19]. Hence, to investigate the role of inflammation in the development of antigenspecific CD8<sup>+</sup> T cells, we monitored CD8<sup>+</sup> T cell responses in L. donovani infected IRF-5deficient mice. To this end, we adoptively transferred CD45.1-OT-I CD8<sup>+</sup> T cells into Irf5<sup>flox/flox</sup>- $CMV-Cre^{-}$ and $Irf5^{flox/flox}-CMV-Cre^{+}$ mice. Mice were subsequently infected with ovalbumintransgenic L. donovani amastigotes. We have previously reported that OT-I CD8<sup>+</sup> T cells undergo clonal expansion between day 3 and 7 after parasite inoculation; by day 14, about 80% of the cells display a central memory-like phenotype [25]. To our surprise, we observed a 3-4 fold increase in the number (Figure 1A) and frequency (Figure 1B) of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells present in the spleen of IRF-5-deficient mice at d7p.i.; no difference was detected at d14p.i. We next analysed the phenotype of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells found in the spleen at d7 and 14p.i. Despite the fact that about 35% of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells had downregulated CD127 (Figure 1C and S1), only 7% of the OT-I cells were CD127<sup>-</sup>KLRG1<sup>+</sup> in the *Cre*<sup>-</sup> group (Figure 1D and S1), suggesting that only a small percentage of the cells were short-lived effector cells (SLEC). In contrast, a significant increase in frequency of CD127<sup>-</sup> (Figure 1C and S1) cells and SLEC (Figure 1D and S1) was noticed in IRF-5-deficient mice at d7 p.i.

Because *Leishmania* is known to induce strong IL-6 and TNF responses [17,18] and IRF5 is known to govern the expression of both cytokines [21-24], we next assessed the mRNA levels

for IL-6 and TNF in the spleen of *L. donovani* infected mice. As expected, IRF-5-deficient mice had a lower expression of IL-6 during the first week of infection (Figure 1E). By d14 p.i., however, both experimental groups expressed similar mRNA levels. In contrast, TNF mRNA levels were higher in  $Cre^{-}$  mice compared to IRF-5 deficient mice during the first 2 weeks of infection (Figure 1F).

Taken together, our data suggest that IRF-5 participates in limiting CD8<sup>+</sup> T cell expansion and hampering the development of SLEC.

#### **2.** Upregulation of HIF-1α in the spleen restricts CD8<sup>+</sup> T cell expansion

Because inflammation is known to induce HIF-1 $\alpha$ , we next proceeded to assess HIF-1 $\alpha$  expression in splenocytes from *L. donovani* infected mice. The hypoxia-inducible transcription factor (HIF-1 $\alpha$ ) is the key regulator in the cellular response to hypoxia [41,42]. Under hypoxic conditions HIF-1 $\alpha$  accumulates and translocates into the nucleus, where it binds the constitutively expressed HIF-1 $\beta$  [43]. The resultant heterodimer binds and triggers transcription of the hypoxia response element-containing genes in all cells [44]. Nevertheless, accumulation and transcriptional activity of HIF-1 $\alpha$  can also be induced at normoxic conditions by pro-inflammatory cytokines such as TNF and IL-1 $\beta$  [45,46], or by TLR ligation [47-49]. Furthermore, *Leishmania* promastigotes were reported to induce HIF-1 $\alpha$  in macrophages [50-52]. Hence, we first investigated whether HIF-1 $\alpha$  expression was at all upregulated in splenocytes following the inoculation of *L. donovani* infected mice (Figure 2A). HIF-1 $\alpha$  upregulation was confirmed on the protein level by western blot (Figure 2B). We next determined if the upregulation of HIF-1 $\alpha$  in splenocytes had a negative effect on CD8<sup>+</sup> T cell

expansion and function. Thus, we generated hemizygous  $Hif1a^{+/-}$  mice by crossing  $Hif1a^{flox/flox}$  with *CMV-Cre* mice. We then monitored adoptively transferred CD45.1-OT-I CD8<sup>+</sup> T cells at day 7 and 14 p.i. in *L. donovani* infected  $Hif1a^{+/-}$  and  $Hif1a^{flox/flox}$ mice. Interestingly, we observed a significant increase in the number (Figure 2C) as well as frequency (Figure 2D) of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells at day 7 p.i. in  $Hif1a^{+/-}$  compared to the control group; at d14 p.i., however, both groups had similar number and frequency of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells in the spleen. As previously seen in IRF-5-deficient mice, increased expansion was paralleled by a higher frequency of CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>hi</sup>CD127<sup>+</sup> cells in  $Hif1a^{+/-}$  mice compared to the control group (Figure 2F and S2). Collectively, our results suggest that HIF-1 $\alpha$  might be involved in limiting CD8<sup>+</sup> T cell expansion and effector cell differentiation.

# L. donovani infection induces HIF-1α expression in CD11c<sup>hi</sup> splenic DCs in an IRF-5-dependent manner

Enhanced CD8<sup>+</sup> T cell responses were only observed at peak expansion in  $Hif1a^{+/-}$  mice. Hence, it is possible that this transcription factor exerts different functions among various cell types. Since dendritic cells play a crucial role during T cell priming, we next assessed the effect of HIF-1 $\alpha$  expression in these cells. First, we wanted to determine if HIF-1 $\alpha$  was at all upregulated in dendritic cells during *L. donovani* infection. As shown in Figure 3A, HIF-1 $\alpha$  was progressively expressed in DCs during the first week of infection. Increased expression was also confirmed on the protein level by western blot (Figure 3B). To determine whether IRF-5-mediated inflammation was at all involved in HIF-1 $\alpha$  upregulation in DCs, we next assessed HIF-1 $\alpha$ mRNA levels in DCs from IRF-5 deficient mice following *L. donovani* infection. Interestingly, HIF-1 $\alpha$  expression was only upregulated in DCs purified from infected IRF-5-sufficient mice, but not in those purified from IRF-5 deficient mice (Figure 3C and D), suggesting that IRF-5 is involved in the induction of HIF-1 $\alpha$  in DCs. Similar results were obtained when HIF-1 $\alpha$ expression was assessed in CD11c<sup>-</sup> splenocytes (Figure 3E). HIF-1 $\alpha$  was not directly induced by IRF-5 in DCs, since we could observe an increase in mRNA levels for HIF-1 $\alpha$  in IRF-5 deficient bone marrow derived DCs infected with *L. donovaniin vitro* (Figure 3F). This implies that IRF-5 is not required for the induction of HIF-1 $\alpha$  when DCs are directly infected by the parasite. Because only a very small percentage of splenic DCs bury parasites during acute infection (Supplemental Figure S3), accumulation of HIF-1 $\alpha$  mRNA in DCs is most likely due to the inflammatory milieu induced by IRF5.

# HIF-1α expression in CD11c<sup>+</sup> cells limits expansion of CD8<sup>+</sup> T cells and favours the induction of MPEC

HIF-1 $\alpha$  upregulation in DCs was shown to reduce their stimulatory capacity for T cell functions in vitro [53]. To investigate the role of HIF-1  $\alpha$  expression in DCs during experimental VL, we generated HIF-1 $\alpha$  conditional knock-out mice by crossing *Hif1a*<sup>flox/flox</sup> with *Cd11c-Cre* mice. Firstly, we assessed whether HIF-1 $\alpha$  expression was abolished in our conditional knock-outs. As shown in Figure S4A, HIF-1 $\alpha$  mRNA levels did not increase in *L. donovani* infected BMDC from *Hif1a*<sup>flox/flox</sup> - *Cd11c-Cre*<sup>+</sup> mice compared to the *Cre*<sup>-</sup> group as measured by real time PCR. Similar results were obtained with CD11c<sup>+</sup> cells purified from the spleen following in vivo infection with *L. donovani* (Figure S4B).

It has been reported that *Leishmania* promastigotes require HIF-1 $\alpha$  for their survival inside macrophages and DCs [50,51]. Thus, we next evaluated whether this transcription factor was

also needed for survival inside DCs by the intracellular and clinically relevant form of the parasite, namely the amastigote. In contrast to promastigotes, amastigotes seemed to survive equally well in BMDC from  $Hifla^{flox/flox}$  - Cd11c- $Cre^+$  mice compared to those derived from the *Cre*<sup>-</sup> group (Figure 4A). We also assessed amastigote survival in purified splenic CD11c<sup>hi</sup> DCs and found no differences at any time point between the two groups of mice (Figure 4B). This suggests that amastigotes were able to survive inside DCs from  $Hifla^{flox/flox} - Cdllc-Cre^+$  mice. We next proceeded to assess CD8<sup>+</sup> T cell responses in our conditional knock-out mice. CD45.1-OT-I CD8<sup>+</sup> T cells were adoptively transferred into  $Hifla^{flox/flox} - Cd11c - Cre^+$  mice and their Cre<sup>-</sup> littermates a day prior to infection with L. donovani amastigotes. CD8<sup>+</sup> T cell responses were then monitored at d7 (peak expansion) and 14 p.i. (end of contraction). Remarkably, OT-I CD8<sup>+</sup> T cells underwent a greater expansion in  $Hifla^{flox/flox}$  -  $Cdllc-Cre^+$  mice compared to their Cre<sup>-</sup> littermates as indicated by a larger number and higher frequency of cells present in the spleen at d7 p.i. (Figure 4 C and D, left panels). Unlike in IRF-5 deficient and  $Hif^{+/-}$  mice, this difference was still observed at d14 p.i., when OT-I CD8<sup>+</sup> T cell numbers were 3-4 fold higher in the conditional knock-out group (Figure 4 C and D, right panels). When we analyzed the phenotype of the adoptively transferred cells, we noticed a significant decrease in CD44<sup>hi</sup>CD62L<sup>hi</sup>CD127<sup>+</sup> OT-I CD8<sup>+</sup> T cells in  $Hifla^{flox/flox}$  - Cd11c- $Cre^+$  mice compared to littermate controls at both time points analyzed (Figure 5A and S5), suggesting that less memory precursor effector cells (MPEC) were generated in those mice. These results were paralleled by an increase in effector cell frequency at d7 and 14 p.i. (Figure 5B and S5), which was reflected in a higher percentage of CD127<sup>-</sup>KLRG1<sup>+</sup> cells (Figure 5C and S5) in *Hif1a<sup>flox/flox</sup>* - *Cd11c-Cre*<sup>+</sup>.

The T-box transcription factors Eomes and T-bet appear to regulate effector/memory differentiation program of  $CD8^+$  T cells. Because we observed an increase in frequency of

SLEC, we were wondering whether Eomes and T-bet were expressed at different level in OT-I CD8<sup>+</sup> T cells adoptively transferred into  $Hif1a^{flox/flox} - Cd11c-Cre^+$  mice compared to their  $Cre^-$  counterpart. As expected, we noticed a significant decrease in Eomes in  $Hif1a^{flox/flox} - Cd11c$ - $Cre^+$  mice at d7 p.i. compared to the HIF-1 $\alpha$  sufficient group (Figure 5D and E). No differences, however, were observed at d14. A light upregulation of T-betwas also observed in OT-I CD8<sup>+</sup> T cells from the  $Cre^+$  group compared to the  $Cre^-$  littermates, but this was not statistically significant (Figure 5F and G).

Interestingly, OT-I CD8<sup>+</sup> T cells also showed a higher cytotoxic capacity in  $Hif1a^{flox/flox}$  - Cd11c- $Cre^+$ micecompared to the control group (Figure 5H and S5C), while maintaining similar levels of IFN $\gamma$ , TNF, and IL-2 production upon restimulation in vitro (data not shown). Taken together, our data suggest that HIF-1 $\alpha$  expression in CD11c<sup>+</sup> cells favours the development of MPEC and limits CD8<sup>+</sup> T cell expansion following *L. donovani* infection.

# 5. HIF-1α hampers IL-12 expression by splenic CD11c<sup>hi</sup> DCs

IL-12 plays an important role in promoting CD8<sup>+</sup> T cell responses. Particularly, this cytokine has been show to induce the development of SLEC by regulating T-bet expression[30,31]. In VL, IL-12 is mainly produced by DCs, however this production is not sustained after 24h [17]. Because more SLEC with a greater cytotoxic capacity were observed in  $Hif1a^{flox/flox} - Cd11c-Cre^+$ mice, we were wondering whether HIF-1 $\alpha$  deficient DCs were producing more IL-12. Hence, we purified CD11c<sup>hi</sup> splenic DCs from *L. donovani* infected mice at various time points after infection and assessed the expression of IL-12p35 by real time PCR. As shown in Figure 6A, IL-12p35 expression was sustained in  $Hif1a^{flox/flox} - Cd11c-Cre^+$ mice compared to the *Cre* control group. Similar results were obtained when we measured IL-12p40 mRNA levels (Figure 6B). We also assessed the expression of IL-10, a cytokine that is known to be associated with susceptibility to experimental VL. IL-10 mRNA accumulation is readily detected in DCs few days after *L. donovani* inoculation and is continuously produced until the chronic phase of the disease [54]. In agreement with the literature, we noticed an increase in IL-10 mRNA levels in the *Cre*<sup>-</sup> group during the first 2 weeks of infection (Figure 6C). In contrast, DCs from  $Hif1a^{flox/flox}$  - *Cd11c-Cre*<sup>+</sup>mice failed to upregulate IL-10 expression during the first week of infection. At d14 p.i., however, IL-10 mRNA levels in the *Cre*<sup>-</sup> group increased but were still significantly lower than the control group. No differences were observed between both groups in the IL-10 mRNA levels of the CD11c negative fraction (data not shown). Interestingly, CD11c<sup>hi</sup> splenic DCs lacking HIF-1 $\alpha$  also expressed lower TNF mRNA levels of the CD11c negative fraction were compared to their HIF-1 $\alpha$ -sufficient counterparts (Figure 6D); similarly to IL-10, TNF mRNA levels of the CD11c negative fraction were comparable in both groups between d5 and 14 p.i. (data not shown).

#### 6. HIF-1α expression in CD11c<sup>+</sup> cells exacerbates disease

Finally, we wanted to determine whether HIF-1 $\alpha$  ablation in DCs had any biological effect on the course of *L. donovani* infection. Hence, we assessed the splenic parasite burden at various time points after infection (Figure 7A). We noticed a significant reduction in the splenic parasite burden in *Hif1a<sup>flox/flox</sup>* - *Cd11c-Cre*<sup>+</sup>mice compared to the *Cre*<sup>-</sup> littermates already at d14p.i. Reduction in the parasite number in *Hif1a<sup>flox/flox</sup>* - *Cd11c-Cre*<sup>+</sup>mice at d14p.i was also confirmed by limiting dilutions (Figure 7B). Interestingly, the hepatic parasite burden in *Hif1a<sup>flox/flox</sup>* -*Cd11c-Cre*<sup>+</sup>mice was not different than their *Cre*- counterpart (Figure 7C), reflecting perhaps a minimal oxygen tension variation in this organ following *L. donovani* infection. Finally, we proceeded to determine whether  $CD8^+$  T cells participate at all to the reduction in parasite numbers observed in the HIF-1 $\alpha$  conditional knock-out group. Hence, we depleted  $CD8^+$  T cells in *L. donovani* infected *Hif1a*<sup>flox/flox</sup> - *Cd11c-Cre*<sup>+</sup> and *Cre*<sup>-</sup> mice, and assessed the parasite burden at d14 p.i. As shown in Figure 7D,  $CD8^+$  T cell depletion only caused a mild and not significant increase in the parasite burden in Cre- mice; in contrast,  $CD8^+$  T cells seem to play an essential role in controlling parasite growth in HIF-1 $\alpha$  conditional knockout mice, suggesting that HIF-1 $\alpha$  induction in DCs is responsible for limiting protective CD8<sup>+</sup> T cell responses.

In conclusion, HIF-1 $\alpha$  induction in DCs represents an immune-evasive mechanism adopted by *Leishmania* to establish chronic infection.

# Discussion

The natural reaction of an organism to a foreign pathogen is to initiate an inflammatory response. This response is essential for effective immunity against the pathogen. In the present study though, we show that the IRF-5-dependent inflammatory milieu induced by *Leishmania* during the first week of infection inhibits  $CD8^+$  T cell expansion and the development of SLECs by inducing HIF-1 $\alpha$  in dendritic cells and consequently altering DC functions. Ablation of HIF-1 $\alpha$  in CD11c<sup>+</sup> cells resulted in a lower parasite burden.

Following infection, antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells expand and acquire effector function necessary for protective immunity. This process is initiated and sustained by inflammatory cytokines which play a major role during the development of CD8<sup>+</sup> T cell responses by providing "signal 3". Indeed, inflammatory cytokines were reported to tune effector/memory differentiation, expansion, and survival of antigen-specific CD8<sup>+</sup> T cells [26-30,55]. IL-12, for instance, is crucial for effector function acquisition following infection with *Listeria monocytogenes* (Ohteki et al., 1999), vaccinia virus [56], and *Toxoplasma gondii*[57]. IL-12 was also shown to participate in the induction of T-bet while repressing Eomes [30,31,58]. In contrast, IL-12 deficiency does not seem to interfere with CD8<sup>+</sup> T cell development following LCMV infection, where type I IFN play the most critical role [36,37]. Hence, it appears that inflammatory cytokines promote and maintain CD8<sup>+</sup> T cell differentiation to effectors while preventing the development of memory cells. It is important to note that most of the work on the role of inflammation in promoting CD8<sup>+</sup> T cells was done in models of acute infection. A recent work showed that a chronic inflammatory environment negatively impacted the development of

 $CD8^+$  T cell responses [40], suggesting that perhaps the composition of the inflammatory milieu rather than inflammation itself determines the outcome of  $CD8^+$  T cell responses. It is thus crucial to identify the pathogen-specific signature of proinflammatory cytokines to determine the effect of inflammation on  $CD8^+$  T cell responses. Our data suggest that IRF-5-mediate inflammation induced by *Leishmania* at early stages of infection plays a detrimental role in the development of protective  $CD8^+$  T cell responses.

IRF5 is involved in the transcriptional activation of both Type I IFN genes and genes encoding for key pro-inflammatory cytokines such as IL-12, TNF, IL-23 and IL-6 [21,22,24,59]. Our recent study using  $Irf5^{-/-}$  mice indicates that IRF5 is essential for the development of protective Th1 responses. In fact, *L. donovani* infected  $Irf5^{-/-}$  mice generate profoundly defective Th1 cells during chronic disease. However, we observed stronger Th1 responses in  $Irf5^{-/-}$  mice during the first two weeks of infection, suggesting that priming of Th1 cells was more effective in the absence of IRF5 and that IRF5 is mainly needed for sustaining Th1 responses [19]. These observations prompted us to think that the strong TNF-dominated inflammatory response induced by *Leishmania* at the onset of infection [18][60] plays a dual role and may help the establishment of chronic infection by inhibiting T cell responses.

To control the inflammatory response launched by foreign pathogens upon encounter with the immune system, the host has evolved several defense mechanisms aimed at tissue protection. One of these mechanisms is the hypoxia-driven, adenosine receptor-mediated immune suppressive pathway. The hypoxia-adenosinergic tissue-protecting pathway is a physiologic response to inflammatory damage, low oxygen tension, and hypoxia-driven accumulation of extracellular adenosine. HIF-1 $\alpha$  is the key regulator in the cellular response to hypoxia [41]. This

pathway is designed to allow the cells to survive in an environment of low oxygen tension, but it also leads to suppression of pro-inflammatory responses [61-64]. Indeed, HIF-1 $\alpha$  suppresses cytokine production in T-cells [64-66], induces the potency and the number of CD25<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> regulatory T-cells [67], induces IL-10 production [68,69], and inhibits DC maturation [53]. Moreover, HIF-1 $\alpha$  expression in tumor-associated macrophages enhances the T cell suppressive capacity of these cells [70,71]; HIF-1 $\alpha$  also causes upregulation of PD-L1 on MDSC, exacerbating their suppressive capacity [72,73].

Under normoxic conditions, HIF-1 $\alpha$  can be upregulated by inflammatory cytokines such as TNF and IL-1 $\beta$ , by TLR agonists, and by several viruses [74,75], bacteria [75,76], and parasites [51,75,77,78]. Leishmania promastigotes are known to stabilize HIF-1a and induce HIF-1a mRNA in host cells [51,52]. Our results indicate that L. donovani amastigotes are also able to induce HIF-1 $\alpha$  mRNA in BMDC; however, unlike for promastigotes [51], HIF-1 $\alpha$  was not required for amastigote survival inside DCs. Interestingly, HIF-1a mRNA was induced in dendritic cells following L. donovani infection in an IRF-5-dependent manner. Because HIF-1a mRNA levels in IRF-5 deficient BMDC infected with L. donovani amastigotes were comparable to those observed in infected IRF-5 sufficient BMDC, we assume that HIF-1 $\alpha$  in DCs is mainly induced by the inflammatory milieu generated by IRF5 rather than the parasite itself. The factor(s) responsible for the induction of HIF-1a in DCs following infection with L. donovani amastigotes are yet unknown. IL-6R and TNF blockade did not affect HIF-1a expression or  $CD8^+$  T cell expansion (unpublished data), suggesting that the upregulation of HIF-1a in DCs does not rely on the effect of a single cytokine. Further investigations are warranted in order to identify the mechanism(s) of HIF-1 $\alpha$  induction in DCs during experimental VL.

HIF-1 $\alpha$  appears to play a dual role in myeloid cells. An important body of literature has demonstrated that HIF-1 $\alpha$  is involved in myeloid cell-mediated inflammation and is critical in the defence against various pathogens [76,79,80]. For instance, macrophages phagocytose and kill bacteria better under hypoxic conditions rather than under normoxic conditions [76,80]. Thus it is not surprising that mice with a targeted deletion of HIF-1 $\alpha$  in myeloid cells are more susceptible to many bacterial and viral pathogens [76,79,81]. In contrast, some pathogens such as *Toxoplasma gondii* and *Leishmania* (promastigotes) require HIF-1 $\alpha$  for their survival inside the cell [50-52,78]. This transcription factor was also shown to enhance replication of some viruses [82-84]. In the tumor microenvironment, HIF-1 $\alpha$  expression in tumor-associated macrophages suppresses T cell responses [70] and induces expression of arginase 1 [71]; HIF-1 $\alpha$  also enhances the inhibitory effect of MDSC [72].

Divergent effects of HIF-1 $\alpha$  upregulation have also been observed in DCs. HIF-1 $\alpha$  appears to play an important role in DC differentiation and migration in a hypoxic environment [53,85]. Nevertheless, this transcription factor impairs the upregulation of CCR7, a chemokine involved in homing of mature DCs to secondary lymphoid organs [53,85]. Moreover, HIF-1 $\alpha$  acts as a negative regulator of plasmacytoid dendritic cell development [86]. Our results reveal a detrimental role for HIF-1 $\alpha$  in DC function during experimental VL. Indeed, the absence of HIF-1 $\alpha$  in DCs resulted in increased CD8 T cell expansion and a higher frequency of SLECs. Interestingly, OT-I CD8<sup>+</sup> T cells were still detectable at a higher frequency at d14 p.i. in  $Hif^{flox/flox}$ - Cd11c-cre<sup>+</sup> mice; in contrast in  $Hif^{+/-}$  mice, the frequency at d14 p.i. was similar to the control group. This difference could possibly be caused by the general reduction in the level of IL-10 expression in infected  $Hif^{+/-}$  mice compared to  $Hif^{flox/flox}$ - Cd11c-cre<sup>+</sup> mice (data not shown). We have previously reported that IL-10 blockade induces increased expansion of CD8<sup>+</sup>T cells [87]. However, in the absence of IL-10, CD8<sup>+</sup> T cells display a more dramatic contraction, at the end of which CD8<sup>+</sup> T cell numbers are similar to those observed in infected wild type mice. This suggests that HIF-1 $\alpha$  expression in some cells is necessary to counterbalance the strong inflammatory responses induced by *L. donovani* and slow down clonal contraction.

*L. donovani* typically induces a swift IL-12 production by DCs at very early stages of infection; this production, however, ceases after 24h of infection [17]. We observed a sustained IL-12p35 and IL12p40 expression in HIF-1 $\alpha$  deficient DCs. This expression was paralleled by a decrease in IL-10 and TNF mRNA levels. This suggests that HIF-1 $\alpha$  directly or indirectly regulates the expression of IL-12, TNF, and IL-10 in dendritic cells. Increased expression of IL-12p35 and p40 may explain the higher frequency of SLECs detected in mice with a targeted deletion of HIF-1 $\alpha$  in CD11c<sup>+</sup> cells and therefore the enhanced expansion. Identifying the mechanism of HIF-1 $\alpha$  induction in DCs will help to understand the physiological role of this transcription factor. It is possible that the pathway of activation as well as the duration of the signal determine the target gene selection and the final effect on DC functions.

In conclusion, we demonstrate that IRF-5-mediated inflammation induced by *L. donovani* at the onset of the infection participate in limiting CD8<sup>+</sup> T cell expansion by upregulating HIF-1 $\alpha$  in DCs and subsequently impairing DC functions. Several pathogens that cause chronic infections induce upregulation of HIF-1 $\alpha$ , which is then directly required for their survival. Our data additionally shows that HIF-1 $\alpha$  induction in DCs that are not the main target of *Leishmania* results in disease susceptibility. It is thus tempting to speculate that targeting the HIF-1 $\alpha$  pathway

may represent a major immune evasive mechanism adopted by some pathogens to establish chronic infection.

### **Material and Methods**

#### Mice and parasites

C57BL/6-Tg(OT-I)-RAG1<sup>tm1Mom</sup> mice and B6-Ly5.1 congenic mice were purchased from The Jackson Laboratory. Mice hemizygous for HIF-1 $\alpha$  were generated by crossing once Hifla<sup>flox/flox</sup> mice with mice expressing the cre-recombinase under the CMV promoter Mice with a targeted HIF-1a mutation in CD11c<sup>+</sup> cells were generated by crossingC57BL/6 Hif1a<sup>flox/flox</sup> mice with mice expressing the cre-recombinase under the CD11c promoter (C57BL/6 Cd11c- $Cre^{+/-}$ ), both purchased by The Jackson Laboratory. IRF-5-deficient mice were generated by crossing C57BL/6 Irf5<sup>flox/flox</sup> mice with mice expressing the cre-recombinase under the CMV promoter (The Jackson Laboratory). C57BL/6 Irf5<sup>flox/flox</sup> mice were a kind gift from Dr. Paula Pitha-Rowe (The Johns Hopkins University). All mice were housed at the INRS animal facility under specific pathogen-free conditions and used at 6–10 weeks of age. Ovalbumin-transgenic parasites were a gift from Drs. P. Kaye and D.F. Smith (University of York, UK). Wild type and ovalbumin transgenic Leishmania donovani (strain LV9) were maintained by serial passage in B6.129S7-Rag1<sup>tm1Mom</sup>/J mice, and amastigotes were isolated from the spleens of infected animals. Mice were infected by injecting  $2 \times 10^7$  amastigotes intravenously via the lateral tail vein. Splenic parasite burdens were determined either by limiting dilutions or by examining methanol-fixed, Giemsa stained tissue impression smears [87]. Data are presented as number of parasites per spleen or as Leishman Donovan Units (LDU).

#### **Ethics statement**

Experiments involving mice were carried out under protocols approved by the Comité Institutionel de Protection des Animaux of the INRS-Institut Armand-Frappier (1110-06, 1110-07). These protocols respect procedures on good animal practice provided by the Canadian Council on animal care.

#### **Adoptive transfer of OT-I cells**

CD45.1-OT-I/RAG1 mice, transgenic for a T cell receptor specific for chicken ovalbumin 257– 264 presented by the MHC class I molecule H-2 K<sup>b</sup>, were used as T cell donors. CD8<sup>+</sup> T cells were enriched from splenocytes of naïve CD45.1-OT-I/RAG1 animals as previously described [25].  $2x10^4$  CD45.1- OT-I CD8<sup>+</sup> T cells were injected into the lateral tail vein of *Irf5<sup>flox/flox</sup>*CMV-*Cre*<sup>+</sup>, *Hif1a*<sup>+/-</sup>, *Hif1a*<sup>flox/flox</sup> *Cd11c-Cre*<sup>+</sup> mice and their respective *Cre*<sup>-</sup> littermate controls.Animals were infected the day after with ovalbumin-transgenic *Leishmania donovani* amastigotes.

#### **PKH67** labelling of parasites

*L. donovani* parasites were stained with PKH67 (Sigma) following manufacturer's instructions, as previously described [87]. Mice received 5 x  $10^7$  PKH67 labeled parasites. Spleens from naïve and infected mice were harvested 24h later and surface stained for flow cytometric analysis.

#### Flow cytometry

Adoptively transferred OT-I CD8<sup>+</sup> T cells were identified by staining splenocytes with FITCconjugated anti-CD45.1 antibody and pacific blue-conjugated anti-CD8 (BD Biosciences). The following antibodies were used to further characterize the OT-I response: APC-conjugated anti-CD44 and anti-KLRG1, PE-Cy5-conjugated anti-CD62L, and PE-conjugated anti-CD127 (all obtained from eBioscience). For all surface markers, cells were directly stained as previously described [25]. For intracellular staining, splenocytes were stimulated with the SIINFEKL peptide for 4 hours in the presence of Brefeldin A and recombinant IL-2, and then stained with FITC-conjugated anti-CD45.1 and pacific blue-conjugated anti-CD8. After fixation, cells were permeabilized and stained with PE-conjugated anti-granzyme B (Invitrogen), PE-conjugated anti-Eomes and anti-IL-2 (BD Biosciences). APC-conjugated anti-INF $\gamma$  and PE-Cy7-conjugated anti-TNF were also used. Flow cytometric analysis was performed with a *BD* LSRFortessa<sup>TM</sup> cell analyzer (Becton Dickinson). One to two millions cells per sample were acquired and analyzed with the FACSDiva or with the flowjo software.

For DCs analysis after injection of PKH67-labelled parasites, spleens were removed 24h after parasite injection and digested with collagenase. Splenocytes were then stained with anti-CD11c-APC, anti-MHCII-PE, anti-CD8-PB, and anti-CD4-PE-Cy7. Flow cytometric analysis was performed with a *BD* LSRFortessa<sup>™</sup> cell analyzer (Becton Dickinson).

#### **Real-time PCR analysis**

Real-time PCR (Stratagene mx3005p Real time PCR System) was used to analyze transcripts levels of HPRT, HIF-1 $\alpha$ , IL-10, IL-12p35, IL-12p40, IL-6, and TNF [19,54,88,89]. Total RNA was insolated using RNeasy (Qiagen) to perform real-time RT-PCR. cDNA was prepared using 500 ng of total RNA using High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Bio Rad). Real time PCRwas performed using standard cycle of amplification.

#### Western Blot Analysis

Total cell protein extracts of CD11c<sup>+</sup> cells purified by MACS and cell sorting from infected and naive mice were pooled and lysed in RIPA buffer (sigma Aldrich, Germany). Equal amounts of protein (15  $\mu$ g) were fractionated by 10% SDS-PAGE. Monoclonal anti-HIF-1 $\alpha$  antibody Hif-1 $\alpha$ 67 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) was used for immunoblot assays. Blots were stripped and reprobed with a polyclonal antibody against  $\beta$ -actin to confirm equal protein loading. [90]. Densitometric analysis was performed by spot densitometry using AlphaImager 3400 imaging software (Alpha Innotech Corporation) and normalized to  $\beta$ -actin control. Values are presented as fold induction compared to the level in naive mice.

#### Survival of L. donovani following in vitro infection

CD11c<sup>+</sup> dendritic cells (DCs) were isolated using anti-CD11c beads (Miltenyi Biotec) [19]. BMDC were generated as previously described [91] and seeded at  $10^6$  cells/ml onto 24-well plates. Cells were subsequently infected with PKH26-stained *L. donovani* amastigotes (Sigma, staining done according to manufacturer's instructions) at a MOI of 5:1. Infected cells were then harvested 24, 48, and 72 h later, fixed with 2% PFA, stained with Hoechst (Invitrogen, staining done according to manufacturer's instructions) and cytospined on PBS/ 1% BSA-prepared slides. Mounted slides were than analyzed using a fluorescent microscope, to evaluate parasite survival and target infection rate.

# CD8 T cell depletion

 $Hif^{lox/flox}$ - Cd11c cre<sup>+</sup> and cre<sup>-</sup> mice were treated bi-weekly with 0.2 mg of anti-CD8 antibody (clone 2.43), starting one day before infection. At day 14 p.i., mice were sacrificed and parasite burdens were determined by limiting dilutions.

# Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a Student's t-test or one-way ANOVA (for the parasite survival experiment), with p<0.05 considered significant. All experiments were conducted independently at least three times.

# Acknowledgments

We thank Dr. Pitha-Rowe (Johns Hopkins University) for the kind gift of C57BL/6-*Irf5*<sup>flox/flox</sup> mice and Dr. Albert Descoteaux for critical reading of the manuscript.

# References

- Omer FM, de Souza JB, Riley EM (2003) Differential induction of TGF-beta regulates proinflammatory cytokine production and determines the outcome of lethal and nonlethal Plasmodium yoelii infections. J Immunol 171: 5430-5436.
- Wu Y, Wang QH, Zheng L, Feng H, Liu J, et al. (2007) Plasmodium yoelii: distinct CD4(+)CD25(+) regulatory T cell responses during the early stages of infection in susceptible and resistant mice. Exp Parasitol 115: 301-304.
- Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL (2002) CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. Nature 420: 502-507.
- 4. Anderson CF, Mendez S, Sacks DL (2005) Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of Leishmania major in C57BL/6 mice. J Immunol 174: 2934-2941.
- Brooks DG, Trifilo MJ, Edelmann KH, Teyton L, McGavern DB, et al. (2006) Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. Nat Med 12: 1301-1309.
- 6. Ejrnaes M, Filippi CM, Martinic MM, Ling EM, Togher LM, et al. (2006) Resolution of a chronic viral infection after interleukin-10 receptor blockade. J Exp Med 203: 2461-2472.
- Hernandez-Pando R, Aguilar D, Hernandez ML, Orozco H, Rook G (2004) Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF-alpha and in the regulation of fibrosis. Eur J Immunol 34: 174-183.
- Beil WJ, Meinardus-Hager G, Neugebauer DC, Sorg C (1992) Differences in the onset of the inflammatory response to cutaneous leishmaniasis in resistant and susceptible mice. J Leukoc Biol 52: 135-142.
- Bogdan C, Donhauser N, Doring R, Rollinghoff M, Diefenbach A, et al. (2000) Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. J Exp Med 191: 2121-2130.
- Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM (1998) Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following Leishmania donovani infection. Eur J Immunol 28: 687-695.
- 11. Iezzi G, Frohlich A, Ernst B, Ampenberger F, Saeland S, et al. (2006) Lymph node resident rather than skin-derived dendritic cells initiate specific T cell responses after Leishmania major infection. J Immunol 177: 1250-1256.

- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, et al. (2008) In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. Science 321: 970-974.
- 13. Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, et al. (2004) The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. Immunol Rev 201: 239-253.
- Ato M, Stager S, Engwerda CR, Kaye PM (2002) Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. Nat Immunol 3: 1185-1191.
- Smelt SC, Engwerda CR, McCrossen M, Kaye PM (1997) Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. J Immunol 158: 3813-3821.
- 16. Engwerda CR, Ato M, Cotterell SE, Mynott TL, Tschannerl A, et al. (2002) A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during Leishmania donovani infection. Am J Pathol 161: 429-437.
- Engwerda CR, Murphy ML, Cotterell SE, Smelt SC, Kaye PM (1998) Neutralization of IL demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of Leishmania donovani. Eur J Immunol 28: 669-680.
- Engwerda CR, Smelt SC, Kaye PM (1996) An in vivo analysis of cytokine production during Leishmania donovani infection in scid mice. Exp Parasitol 84: 195-202.
- Paun A, Bankoti R, Joshi T, Pitha PM, Stager S (2011) Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to Leishmania donovani infection. PLoS Pathog 7: e1001246.
- 20. Schoenemeyer A, Barnes BJ, Mancl ME, Latz E, Goutagny N, et al. (2005) The interferon regulatory factor, IRF5, is a central mediator of toll-like receptor 7 signaling. J Biol Chem 280: 17005-17012.
- Barnes BJ, Richards J, Mancl M, Hanash S, Beretta L, et al. (2004) Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. J Biol Chem 279: 45194-45207.
- 22. Takaoka A, Yanai H, Kondo S, Duncan G, Negishi H, et al. (2005) Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. Nature 434: 243-249.
- 23. Honda K, Takaoka A, Taniguchi T (2006) Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. Immunity 25: 349-360.

- 24. Honda K, Taniguchi T (2006) IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. Nat Rev Immunol 6: 644-658.
- 25. Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn IA, Stager S (2009) B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against Leishmania donovani infections. PLoS Pathog 5: e1000431.
- Pham NL, Badovinac VP, Harty JT (2011) Differential role of "Signal 3" inflammatory cytokines in regulating CD8 T cell expansion and differentiation in vivo. Front Immunol 2: 4.
- 27. Curtsinger JM, Gerner MY, Lins DC, Mescher MF (2007) Signal 3 availability limits the CD8 T cell response to a solid tumor. J Immunol 178: 6752-6760.
- 28. Curtsinger JM, Mescher MF (2010) Inflammatory cytokines as a third signal for T cell activation. Curr Opin Immunol 22: 333-340.
- 29. Haring JS, Badovinac VP, Harty JT (2006) Inflaming the CD8+ T cell response. Immunity 25: 19-29.
- 30. Joshi NS, Cui W, Chandele A, Lee HK, Urso DR, et al. (2007) Inflammation directs memory precursor and short-lived effector CD8(+) T cell fates via the graded expression of T-bet transcription factor. Immunity 27: 281-295.
- 31. Takemoto N, Intlekofer AM, Northrup JT, Wherry EJ, Reiner SL (2006) Cutting Edge: IL-12 inversely regulates T-bet and eomesodermin expression during pathogen-induced CD8+ T cell differentiation. J Immunol 177: 7515-7519.
- Curtsinger JM, Lins DC, Johnson CM, Mescher MF (2005) Signal 3 tolerant CD8 T cells degranulate in response to antigen but lack granzyme B to mediate cytolysis. J Immunol 175: 4392-4399.
- Badovinac VP, Tvinnereim AR, Harty JT (2000) Regulation of antigen-specific CD8+ T cell homeostasis by perform and interferon-gamma. Science 290: 1354-1358.
- 34. Curtsinger JM, Valenzuela JO, Agarwal P, Lins D, Mescher MF (2005) Type I IFNs provide a third signal to CD8 T cells to stimulate clonal expansion and differentiation. J Immunol 174: 4465-4469.
- 35. Stager S, Alexander J, Kirby AC, Botto M, Rooijen NV, et al. (2003) Natural antibodies and complement are endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. Nat Med 9: 1287-1292.

- 36. Kolumam GA, Thomas S, Thompson LJ, Sprent J, Murali-Krishna K (2005) Type I interferons act directly on CD8 T cells to allow clonal expansion and memory formation in response to viral infection. J Exp Med 202: 637-650.
- Aichele P, Unsoeld H, Koschella M, Schweier O, Kalinke U, et al. (2006) CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion. J Immunol 176: 4525-4529.
- 38. Whitmire JK, Tan JT, Whitton JL (2005) Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. J Exp Med 201: 1053-1059.
- Richer MJ, Nolz JC, Harty JT (2013) Pathogen-specific inflammatory milieux tune the antigen sensitivity of CD8(+) T cells by enhancing T cell receptor signaling. Immunity 38: 140-152.
- Stelekati E, Shin H, Doering TA, Dolfi DV, Ziegler CG, et al. (2014) Bystander chronic infection negatively impacts development of CD8(+) T cell memory. Immunity 40: 801-813.
- Semenza GL (2009) Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. Physiology (Bethesda) 24: 97-106.
- Semenza GL (2009) Regulation of cancer cell metabolism by hypoxia-inducible factor 1.
  Semin Cancer Biol 19: 12-16.
- 43. Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, et al. (1996) Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem 271: 32529-32537.
- 44. Semenza GL (2007) Hypoxia and cancer. Cancer Metastasis Rev 26: 223-224.
- 45. Jung Y, Isaacs JS, Lee S, Trepel J, Liu ZG, et al. (2003) Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting proteindependent nuclear factor kappa B activation. Biochem J 370: 1011-1017.
- 46. Zhou J, Schmid T, Brune B (2003) Tumor necrosis factor-alpha causes accumulation of a ubiquitinated form of hypoxia inducible factor-1alpha through a nuclear factor-kappaBdependent pathway. Mol Biol Cell 14: 2216-2225.

- 47. Spirig R, Djafarzadeh S, Regueira T, Shaw SG, von Garnier C, et al. (2010) Effects of TLR agonists on the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1alpha and dendritic cell maturation under normoxic conditions. PLoS One 5: e0010983.
- 48. Rius J, Guma M, Schachtrup C, Akassoglou K, Zinkernagel AS, et al. (2008) NF-kappaB links innate immunity to the hypoxic response through transcriptional regulation of HIF-1alpha. Nature 453: 807-811.
- 49. Tacchini L, Gammella E, De Ponti C, Recalcati S, Cairo G (2008) Role of HIF-1 and NFkappaB transcription factors in the modulation of transferrin receptor by inflammatory and anti-inflammatory signals. J Biol Chem 283: 20674-20686.
- 50. Degrossoli A, Arrais-Silva WW, Colhone MC, Gadelha FR, Joazeiro PP, et al. (2011) The influence of low oxygen on macrophage response to Leishmania infection. Scand J Immunol 74: 165-175.
- 51. Degrossoli A, Bosetto MC, Lima CB, Giorgio S (2007) Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in mononuclear phagocytes infected with Leishmania amazonensis. Immunol Lett 114: 119-125.
- 52. Singh AK, Mukhopadhyay C, Biswas S, Singh VK, Mukhopadhyay CK (2012) Intracellular pathogen Leishmania donovani activates hypoxia inducible factor-1 by dual mechanism for survival advantage within macrophage. PLoS One 7: e38489.
- 53. Mancino A, Schioppa T, Larghi P, Pasqualini F, Nebuloni M, et al. (2008) Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions. Blood 112: 3723-3734.
- 54. Maroof A, Beattie L, Zubairi S, Svensson M, Stager S, et al. (2008) Posttranscriptional regulation of II10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. Immunity 29: 295-305.
- 55. Ohteki T, Fukao T, Suzue K, Maki C, Ito M, et al. (1999) Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. J Exp Med 189: 1981-1986.
- 56. Xiao Z, Casey KA, Jameson SC, Curtsinger JM, Mescher MF (2009) Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN. J Immunol 182: 2786-2794.
- 57. Wilson DC, Grotenbreg GM, Liu K, Zhao Y, Frickel EM, et al. (2010) Differential regulation of effector- and central-memory responses to Toxoplasma gondii Infection by IL-12 revealed by tracking of Tgd057-specific CD8+ T cells. PLoS Pathog 6: e1000815.

- 58. Rao RR, Li Q, Odunsi K, Shrikant PA (2010) The mTOR kinase determines effector versus memory CD8+ T cell fate by regulating the expression of transcription factors T-bet and Eomesodermin. Immunity 32: 67-78.
- Barnes BJ, Moore PA, Pitha PM (2001) Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes. J Biol Chem 276: 23382-23390.
- 60. Arango Duque G, Fukuda M, Turco SJ, Stager S, Descoteaux A (2014) Leishmania Promastigotes Induce Cytokine Secretion in Macrophages through the Degradation of Synaptotagmin XI. J Immunol 193: 2363-2372.
- Ohta A, Sitkovsky M (2001) Role of G-protein-coupled adenosine receptors in downregulation of inflammation and protection from tissue damage. Nature 414: 916-920.
- 62. Sitkovsky M, Lukashev D (2005) Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. Nat Rev Immunol 5: 712-721.
- 63. Hasko G, Linden J, Cronstein B, Pacher P (2008) Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. Nat Rev Drug Discov 7: 759-770.
- 64. Csoka B, Himer L, Selmeczy Z, Vizi ES, Pacher P, et al. (2008) Adenosine A2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function. Faseb J 22: 3491-3499.
- 65. Lukashev D, Klebanov B, Kojima H, Grinberg A, Ohta A, et al. (2006) Cutting edge: hypoxia-inducible factor 1alpha and its activation-inducible short isoform I.1 negatively regulate functions of CD4+ and CD8+ T lymphocytes. J Immunol 177: 4962-4965.
- 66. Thiel M, Caldwell CC, Kreth S, Kuboki S, Chen P, et al. (2007) Targeted deletion of HIF-1alpha gene in T cells prevents their inhibition in hypoxic inflamed tissues and improves septic mice survival. PLoS One 2: e853.
- 67. Ben-Shoshan J, Maysel-Auslender S, Mor A, Keren G, George J (2008) Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha. Eur J Immunol 38: 2412-2418.
- 68. Panther E, Corinti S, Idzko M, Herouy Y, Napp M, et al. (2003) Adenosine affects expression of membrane molecules, cytokine and chemokine release, and the T-cell stimulatory capacity of human dendritic cells. Blood 101: 3985-3990.

- 69. Brenner S, Prosch S, Schenke-Layland K, Riese U, Gausmann U, et al. (2003) cAMPinduced Interleukin-10 promoter activation depends on CCAAT/enhancer-binding protein expression and monocytic differentiation. J Biol Chem 278: 5597-5604.
- 70. Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, et al. (2010) Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. Cancer Res 70: 7465-7475.
- Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, et al. (2014) Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature 513: 559-563.
- 72. Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, et al. (2010) HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. J Exp Med 207: 2439-2453.
- 73. Noman MZ, Desantis G, Janji B, Hasmim M, Karray S, et al. (2014) PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. J Exp Med 211: 781-790.
- 74. Kilani MM, Mohammed KA, Nasreen N, Tepper RS, Antony VB (2004) RSV causes HIF-1alpha stabilization via NO release in primary bronchial epithelial cells. Inflammation 28: 245-251.
- 75. Nizet V, Johnson RS (2009) Interdependence of hypoxic and innate immune responses. Nat Rev Immunol 9: 609-617.
- 76. Peyssonnaux C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, et al. (2005) HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. J Clin Invest 115: 1806-1815.
- 77. Spear W, Chan D, Coppens I, Johnson RS, Giaccia A, et al. (2006) The host cell transcription factor hypoxia-inducible factor 1 is required for Toxoplasma gondii growth and survival at physiological oxygen levels. Cell Microbiol 8: 339-352.
- 78. Brown KM, Suvorova E, Farrell A, McLain A, Dittmar A, et al. (2014) Forward genetic screening identifies a small molecule that blocks Toxoplasma gondii growth by inhibiting both host- and parasite-encoded kinases. PLoS Pathog 10: e1004180.
- 79. Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Forster I, Pawlinski R, et al. (2003) HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. Cell 112: 645-657.

- 80. Anand RJ, Gribar SC, Li J, Kohler JW, Branca MF, et al. (2007) Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1alpha-dependent manner. J Leukoc Biol 82: 1257-1265.
- Hwang, II, Watson IR, Der SD, Ohh M (2006) Loss of VHL confers hypoxia-inducible factor (HIF)-dependent resistance to vesicular stomatitis virus: role of HIF in antiviral response. J Virol 80: 10712-10723.
- 82. Vassilaki N, Kalliampakou KI, Kotta-Loizou I, Befani C, Liakos P, et al. (2013) Low oxygen tension enhances hepatitis C virus replication. J Virol 87: 2935-2948.
- 83. Veeranna RP, Haque M, Davis DA, Yang M, Yarchoan R (2012) Kaposi's sarcomaassociated herpesvirus latency-associated nuclear antigen induction by hypoxia and hypoxia-inducible factors. J Virol 86: 1097-1108.
- 84. Tomaskova J, Oveckova I, Labudova M, Lukacikova L, Laposova K, et al. (2011) Hypoxia induces the gene expression and extracellular transmission of persistent lymphocytic choriomeningitis virus. J Virol 85: 13069-13076.
- Kohler T, Reizis B, Johnson RS, Weighardt H, Forster I (2012) Influence of hypoxiainducible factor 1alpha on dendritic cell differentiation and migration. Eur J Immunol 42: 1226-1236.
- 86. Weigert A, Weichand B, Sekar D, Sha W, Hahn C, et al. (2012) HIF-1alpha is a negative regulator of plasmacytoid DC development in vitro and in vivo. Blood 120: 3001-3006.
- Bankoti R, Gupta K, Levchenko A, Stager S (2012) Marginal zone B cells regulate antigenspecific T cell responses during infection. J Immunol 188: 3961-3971.
- 88. Stager S, Maroof A, Zubairi S, Sanos SL, Kopf M, et al. (2006) Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against Leishmania donovani and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. Eur J Immunol 36: 1764-1771.
- 89. Patel TH, Kimura H, Weiss CR, Semenza GL, Hofmann LV (2005) Constitutively active HIF-1alpha improves perfusion and arterial remodeling in an endovascular model of limb ischemia. Cardiovasc Res 68: 144-154.
- 90. Sarkar K, Cai Z, Gupta R, Parajuli N, Fox-Talbot K, et al. (2012) Hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activity in endothelial cells is required for acute phase cardioprotection induced by ischemic preconditioning. Proc Natl Acad Sci U S A 109: 10504-10509.

91. Ranatunga D, Hedrich CM, Wang F, McVicar DW, Nowak N, et al. (2009) A human IL10 BAC transgene reveals tissue-specific control of IL-10 expression and alters disease outcome. Proc Natl Acad Sci U S A 106: 17123-17128.

### **Figure legends**

Figure 1.IRF-5-mediated inflammation limits  $CD8^+$  T cell expansion during acute *L*. *donovani* infection. (A)  $2x10^4$  OT-I CD8<sup>+</sup> T cells were adoptively transferred into recipient mice a day prior to infection with ovalbumin-transgenic (PINK) *L. donovani* amastigotes. Graph represents the average number of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells found in the spleen from *Irf-5*<sup>flax/flax</sup> *CMV-Cre*<sup>+</sup> and *Cre*<sup>-</sup> mice at d7 and d14 p.i.. (B) Percentage of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells at d7 and d14 post infection. (C) Percentage of gated OT-I CD8<sup>+</sup> that were negative for CD127. (D) Percentage of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells that did not express CD127 and are positive for KLRG1. Real-time PCR analysis of IL-6 (E) and TNF (F) expression in CD11c<sup>+</sup> cells from *Irf-5*<sup>flax/flax</sup>*CMV-Cre*<sup>+</sup> and *Cre<sup>-</sup>* at various time points after infection. All data represent mean ± SEM of one of 3 independent experiments, n = 5. \* denotes *p*<0.05, \*\* denotes *p*<0.01 and \*\*\* denotes *p*<0.001.

Figure 2. Upregulation of HIF-1 $\alpha$  in the spleen restricts CD8<sup>+</sup> T cell expansion. (A-B) Mice were infected with  $2x10^7$  amastigotes intravenously and euthanized at various time points after infection. HIF-1 $\alpha$  expression in splenocytes was assessed by real-time PCR (A) and immunoblot analysis (B). (C-F)  $2x10^4$  OT-I CD8<sup>+</sup> T cells were adoptively transferred into recipient mice a day prior to infection with ovalbumin-transgenic (PINK) *L. donovani* amastigotes. (C) Graphs represent the average number of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells found in the spleen from *Hif1a*<sup>flox/flox</sup> and *Hif1a*<sup>+/-</sup> *mice* at d7 and d14 p.i.. (D) Percentage of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells at d7 and d14 p.i.. (E) Percentage of gated OT-I CD8<sup>+</sup> expressing CD62L<sup>lo/int</sup> and negative for CD127. (F) Percentage of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells that were CD44<sup>+</sup> CD127<sup>+</sup>CD62L<sup>hi</sup>. All data represent mean ± SEM of one of 3 independent experiments, n = 5. \* denotes p<0.05 and \*\* denotes p<0.01. Figure 3.L. donovani infection induces HIF-1a expression in CD11c<sup>hi</sup> splenic DCs in an IRF-5 dependent manner. Mice were infected with  $2x10^7$  amastigotes intravenously. (A) Realtime PCR analysis of HIF-1a mRNA expression in CD11c<sup>+</sup> cells purified from C57BL/6 mice at various time points after infection. (B) Immunoblot analysis of HIF-1a expression in CD11c<sup>+</sup> cells from C57BL/6 mice (upper panel) and densitometric analysis normalized to  $\beta$ -actin expression and expressed as fold increase to results obtained with naïve mice (lower panel). (C) Real-time PCR analysis of HIF-1a expression in sorted CD11c<sup>+</sup> cells from *Irf-5<sup>flax/flax</sup> Cre*<sup>-</sup> and *Irf-5<sup>flax/flax</sup> CMV-Cre*<sup>+</sup>. (D) Immunoblot analysis of *Hif-1a* expression in CD11c<sup>+</sup> cells population of *Irf5<sup>flax/flax</sup> Cre*<sup>-</sup> (left upper panel) and *Irf-5<sup>flax/flax</sup> CMV-Cre*<sup>+</sup> (right upper panel), and densitometric analysis normalized to  $\beta$ -actin expression and expressed as fold increase to results obtained expressed as fold increase to results obtained to R-actin CD11c<sup>+</sup> cells from *Irf-5<sup>flax/flax</sup> Cre*<sup>-</sup> and *Irf-5<sup>flax/flax</sup> Cre*<sup>-</sup> (left upper panel) and *Irf-5<sup>flax/flax</sup> CMV-Cre*<sup>+</sup> (right upper panel), and densitometric analysis normalized to  $\beta$ -actin expression and expressed as fold increase to results obtained with naïve mice (lower panels). (E) Real-time PCR analysis of Hif-1a expression in CD11c<sup>-</sup> splenocytes from *Irf-5<sup>flax/flax</sup> Cre*<sup>-</sup> and *Irf-5<sup>flax/flax</sup> CMV-Cre*<sup>+</sup>. (F) Real-time PCR analysis of HIF-1a mRNA expression in BMDC from *Irf-5<sup>flax/flax</sup> CMV-Cre*<sup>+</sup> and *Cre*<sup>-</sup> mice. All data represent mean  $\pm$  SEM combined from 3 independent experiments.

Figure 4.HIF-1a expression in CD11c<sup>+</sup> cells limits expansion of CD8<sup>+</sup> T cells. (A-B) Percentage of *in vitro* infected *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre<sup>-</sup>* and *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre<sup>+</sup>* BMDC (A) and CD11c<sup>+</sup> cells (B). (C)  $2x10^4$  OT-I CD8<sup>+</sup> T cells were adoptively transferred into recipient mice a day prior to infection with  $2x10^7$  ovalbumin-transgenic (PINK) *L. donovani* amastigotes. Graph represents the average number of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells found in the spleen from *Hif-* $1a^{flox/flox}Cd11c-Cre^+$  and *Cre<sup>-</sup>* at d7 p.i. (left panel) and d14 p.i. (right panel). (D) Percentage of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells at d7 p.i. (left panel) and d14 p.i. (right panel). All data is presented as the mean  $\pm$  SEM of one of three independent experiments, n=5. \* denotes *p*<0.05, \*\* denotes *p*<0.01 and \*\*\* denotes p<0.001.

Figure 5. Depletion of HIF1a in CD11c<sup>+</sup> cells induces more SLECs during the acute phase of *L. donovani* infection.  $2x10^4$  OT-I CD8<sup>+</sup> T cells were adoptively transferred into *Hif* $la^{flax/flox}Cd11c$ -Cre<sup>-</sup> and *Hif-* $la^{flax/flox}Cd11c$ -Cre<sup>+</sup> mice. One day after, mice were infected with ovalbumin-transgenic (PINK) *L. donovani* amastigotes. OT-I CD8<sup>+</sup> T cells were identified by gating on CD8<sup>+</sup> CD45.1 cells from spleen of infected mice at d7 and 14 p.i. (A) Graph represents the frequency of CD44<sup>hi</sup> CD62L<sup>hi</sup> CD127<sup>+</sup> OT-I CD8<sup>+</sup> T cells. (B) Percentage of gated OT-I CD8<sup>+</sup> cells that expressed low/intermediate levels of CD62L and were negative for CD127. (C) Percentage of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells positive for KLRG1. (D and F) Percentage of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells positive for Eomes (D) and T-bet (F). (E and G) Representative histograms for Eomes (E) and T-bet (G) staining for OT-I CD8<sup>+</sup> T cells at day 7 and 14 p.i. (H) Percentage of OT-I CD8<sup>+</sup> T cells positive for granzyme B. All data is presented as the mean ± SEM of one of three independent experiments, n=5. \* denotes p<0.05, \*\* denotes p<0.01 and \*\*\* denotes p<0.001.

**Figure 6. HIF-1** $\alpha$  hampers dendritic cell function. Mice were infected with 2x10<sup>7</sup> amastigotes intravenously. Real-time PCR analysis of IL-12p35 (A), IL-12p40 (B), IL-10 (C), and TNF (D) expression in CD11c<sup>+</sup> cells from *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre*<sup>-</sup> and *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre*<sup>+</sup> mice over the course of infection. All data represent mean ± SEM combined from 3 independent experiments.
Figure 7. HIF-1*a* expression in CD11c<sup>+</sup> cells exacerbates disease.*Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre<sup>-</sup>* and*Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre*<sup>+</sup>mice were infected i.v. with  $2x10^7$  PINK *L. donovani* amastigotes. (A) Graph represents the splenic parasite burden expressed as Leishman Donovan Units (LDU) at various time points after infection. (B) The splenic parasite burden was determined by limiting dilutions at d 14 p.i. (C) Graph represents the hepatic parasite burden in infected *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre<sup>-</sup>* and*Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre<sup>+</sup>*mice. All data is presented as the mean  $\pm$  SEM, n=5. \* denotes p<0.05, \*\* denotes p<0.01 and \*\*\* denotes p<0.001.

#### **Supplemental Figure legends**

#### Figure S1

(A) Representative FACS plots depicting the gating strategy used to detect adoptively transferred CD45.1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> OT-I cells. (B) Modulation of expression of CD127 at d7 (upper panels) and 14 p.i. (lower panels). Representative FACS plot for  $Irf5^{flox/flox}CMV-Cre^+$ (left panels) and  $Irf5^{flox/flox}CMV-Cre^-$ (right panels) (C) Modulation of expression of CD127 and KLRG1 at d7 (upper panels) and 14 p.i. (lower panels). Representative FACS plot for  $Irf5^{flox/flox}CMV-Cre^+$ (left panels) and 14 p.i. (lower panels). Representative FACS plot for  $Irf5^{flox/flox}CMV-Cre^+$ (left panels) and  $Irf5^{flox/flox}CMV-Cre^-$ (right panels). Representative FACS plot for  $Irf5^{flox/flox}CMV-Cre^+$ (left panels) and  $Irf5^{flox/flox}CMV-Cre^-$ (right panels).

#### Figure S2

(A) Modulation of expression of CD127 and CD62L at d7 (upper panels) and 14 p.i. (lower panels). Representative FACS plot for  $Hif-1\alpha^{flox/WT}CMV-Cre^+$  (left panels) and  $Hif-1\alpha^{flox/flox}$  mice (right panels).

#### Figure S3

Mice were infected with  $5 \times 10^7$  PKH67-labelled *L. donovani* amastigotes intravenously and sacrificed 24h later. The percentage of PKH67<sup>+</sup> DCs was determined by flow cytometry.

#### Figure S4

(A) Real-time PCR analysis of HIF-1 $\alpha$  mRNA expression in *Hif-1\alpha^{flox/floxCd11c-Cre^-* $}$  and *Hif-1\alpha^{flox/floxCd11c-Cre^+}* BMDC infected *in vitro* at a MOI of 1:2, 1:5, and 1:10. (B) Real-time PCR analysis of HIF-1 $\alpha$  mRNA expression in sorted CD11c<sup>+</sup> cells from *Hif-1\alpha^{flox/flox}Cd11c-Cre^-* and *Hif-1\alpha^{flox/flox}Cd11c-Cre^-* mice over the course of infection.

#### Figure S5

(A) Modulation of expression of CD127 and CD62L at d7 (upper panels) and 14 p.i. (lower panels). Representative FACS plot for  $Hif-1\alpha^{flox/flox}Cd11c-Cre^+$ (left panels) and  $Hif-1\alpha^{flox/flox}Cd11c-Cre^-$ (left panels) and  $Hif-1\alpha^{flox/flox}Cd11c-Cre^-$ (left panels) and 14 p.i. (lower panels). (B) Modulation of expression of KLRG1 at d7 (upper panels) and 14 p.i. (lower panels). Representative FACS plot for  $Hif-1\alpha^{flox/flox}Cd11c-Cre^+$ (left panels) and  $Hif-1\alpha^{flox/flox}Cd11c-Cre^+$ (left panels) and  $Hif-1\alpha^{flox/flox}Cd11c-Cre^-$ (left panels).

## Figures

## Figure 1.



Figure 2.







# of OI-I cells/shleen (10,) # of OI-I cells/shleen (10,) # of OI-I cells/shleen (10,)



Е

С



F

D

Figure 3.











F





Figure 4.



81P

MAP







С







IL-12p40



D

TNF



Figure 7.



## **Supplemental Figure**

## Figure S1.



## Figure S2.

 $WT = Hif - 1 \alpha^{flow flow}$ 

 $KO = Hif-1\alpha^{flow/WT} CMV-cre^+$ 

А



Figure S3.







В



## Figure S5.

 $WT = Hif-1\alpha^{flow/flow} cre^{-1}$ 

 $KO = Hif - 1\alpha^{flow flow} CD11c - cre^+$ 









С



**Chapitre 2** 

HIF-1α is a key regulator in potentiating suppressor activity and limiting the microbicidal capacity of MDSC-like cells during visceral leishmaniasis

#### Résumé

Le parasite intracellulaire *Leishmania donovani* est responsable de l'induction de la myelopoièse et l'augmentation dramatique de la myelopoièse extramédullaire. Ce phénomène favorise une splénomégalie accompagnée d'une destruction de la microarchitecture de la rate ainsi que l'installation d'un microenvironnement inflammatoire chronique aboutissant à une immunosuppression. Les tissus chroniquement inflammés sont en état d'hypoxie. Dans cette étude nous explorons le rôle de cette hypoxie dans la fonction des cellules myéloïdes durant la phase chronique de la leishmaniose viscérale. Nos résultats indiquent que le parasite induit une sortie massive de la moelle osseuse des monocytes à phénotype régulateur. Une fois présent dans la rate, les cellules myéloïdes acquièrent une fonction semblable à celle des MDSC d'une manière dépendante du facteur de transcription HIF-1a. Ce facteur est aussi impliqué d'une part dans la polarisation des macrophages vers un phénotype M2 et d'autre part dans la susceptibilité envers le parasite des monocytes en phase intermédiaire de différenciation. L'ensemble de ces données nous montrent que HIF-1a est un facteur critique pour l'établissement de l'infection chronique ainsi que l'instauration de la fonction immunosuppressive et la diminution de la capacité leishmanicide des cellules myéloïdes.

HIF-1 $\alpha$  is a key regulator in potentiating suppressor activity and limiting the microbicidal capacity of MDSC-like cells during visceral leishmaniasis

Akil Hammami, Belma Melda Abidin, Tania Charpentier, Aymeric Fabié, Annie-Pier Duguay, Krista M. Heinonen, and Simona Stäger

INRS-Institut Armand-Frappier and Center for Host-Parasite interactions, 531 Boulevard des Prairies, Laval (QC), H7V 1B7, Canada

Running title: HIF-1a exacerbates MDSC-like inhibitory functions during infection

Address correspondence to: Simona Stäger

INRS – Institut Armand-Frappier 531, Boulevard des Prairies Laval, QC H7V 1B7 Canada Phone: +1- 450-687-5010, ext. 4403 Fax: +1- 450-686-5501

simona.stager@iaf.inrs.ca

#### Abstract

*Leishmania donovani* is known to induce myelopoiesis and to dramatically increase extramedullary myelopoiesis. This results in splenomegaly, which is then accompanied by disruption of the splenic microarchitecture, a chronic inflammatory environment, and immunosuppression. Chronically inflamed tissues are typically hypoxic. The role of hypoxia on myeloid cell functions during visceral leishmaniasis has not yet been studied. Here we show that *L. donovani* promotes the output from the bone marrow of monocytes with a regulatory phenotype that function as safe targets for the parasite. We also demonstrate that splenic myeloid cells acquire MDSC-like function in a HIF-1 $\alpha$ -dependent manner. HIF-1 $\alpha$  is also involved in driving the polarization towards M2-like macrophages and rendering intermediate stage monocytes more susceptible to *L. donovani* infection. Our results suggest that HIF-1 $\alpha$  is a major player in the establishment of chronic *Leishmania* infection and is crucial for enhancing immunosuppressive functions and lowering leishmanicidal capacity of myeloid cells.

#### **Author summary**

The protozoan parasite *Leishmania donovani* causes chronic infection in the spleen, which is accompanied by a chronic inflammatory environment, an enlargement of the organ, and immunosuppression. The environment of chronically inflamed tissues is characterized by low oxygen levels and tissue disruption, which induce the expression of the transcription factor HIF- $1\alpha$  in all cells. The kinetics of monocyte production and differentiation in the bone marrow and the spleen, and the role of hypoxia in myeloid cell functions during visceral leishmaniasis have not yet been studied. Here we show that *L. donovani* promotes the output from the bone marrow of monocytes with a regulatory phenotype that function as safe targets for the parasite. We also demonstrate that HIF- $1\alpha$  potentiates inhibitory functions of myeloid cells and is involved in driving the polarization towards M2-like macrophages and rendering them more susceptible to *L. donovani* infection. Our results suggest that HIF- $1\alpha$  is a major player in the establishment of chronic *Leishmania* infection and is crucial for enhancing immunosuppressive functions and lowering leishmanicidal capacity of myeloid cells.

#### Introduction

Elimination of intracellular pathogens requires the induction of pro-inflammatory cytokines and cytotoxic molecules secretion. Unfortunately, this process also leads to local tissue disruption and inflammation. Inflamed tissues represent a challenging microenvironment, characterized by hypoxia, acidosis and hypoglycemia. This microenvironment typically causes the stabilization of the transcription factor HIF-1 $\alpha$ , the master regulator of the response to hypoxia [1, 2]. HIF-1 $\alpha$  has pleiotropic functions aimed at protecting tissues from injury and helping cells to adapt to a difficult microenvironment. However, stabilization of HIF-1 $\alpha$  in some cells of the immune system, such as myeloid cells, may also have unwanted consequences. For instance, HIF-1 $\alpha$  is responsible for the polarization towards the M2-like phenotype of tumor-associated macrophages (TAM) [3], promoting therefore tumor growth. HIF-1 $\alpha$  was also shown to enhance function and differentiation of myeloid derived suppressor cells (MDSC) in the tumor microenvironment [4]. Moreover, we have reported that HIF-1 $\alpha$  stabilization in dendritic cells inhibited their function and consequently limited the expansion of protective CD8 T cell responses during experimental visceral leishmaniasis (VL) [5].

The HIF-pathway is also exploited by some pathogens for their replication and/or survival inside the host's cell [6-9]. One example of such a pathogen is *Leishmania*. The protozoan parasite *Leishmania* is the causative agent of leishmaniasis, a disease with multiple clinical manifestations ranging from self-healing cutaneous and mucocutaneous lesions to potentially lethal visceral infections. The promastigote form of the parasite is transmitted to the host by a sandfly vector. Once inside the host, promastigotes transform into amastigotes. Macrophages are the main target cells of the parasite. However, to survive inside macrophages, *Leishmania* needs to attenuate their microbicidal potential [10]. One of the many strategies is the stabilization of HIF-1 $\alpha$  [11], which appears to be essential for the survival of the promastigote form inside the cell [6, 11]. HIF-1 $\alpha$  stabilization can occur following massive infiltration by pro-inflammatory cells in the tissue and/or as a consequence of pathogen invasion. These two phenomena are associated with increased oxygen consumption, which causes a local hypoxic environment [12]. During visceral leishmaniasis, HIF-1 $\alpha$  stabilization is also induced in uninfected cells by the inflammatory environment and appears to hamper DC functions [5]. To date, the role of HIF-1 $\alpha$  in other myeloid cells during in vivo *Leishmania* infections has not yet been explored.

Dendritic cells and neutrophils have been extensively studied in various models of leishmaniasis; however, the contribution of monocytes to susceptibility and/or resistance to infection is still unclear. The early literature proposes a possible role of "undifferentiated macrophage-granulocytes" as safe targets for *Leishmania*, contributing therefore to disease susceptibility [13]. Passos et al. [14] demonstrate that intermediate monocytes are involved in mediating immunopathology in patients infected with *L. braziliensis*. Another study reports the upregulation of A<sub>2B</sub> adenosine receptors on human monocytes and the association of this upregulation with pathogenicity in patients exposed to *L. donovani* [15]. In contrast, monocyte-derived DC appear to be essential for priming protective Th1 responses in *L. major* infected mice [16] and classical monocytes are thought to be able to kill *L. major* [17] and *L. braziliensis* via reactive oxygen species [18].

In this study, we wanted to investigate the role of HIF-1 $\alpha$  stabilization in myeloid cells, particularly monocytes, during experimental chronic VL. We found that myeloid cells are increasingly recruited to the spleen during chronic infection. Splenic myeloid cells upregulate HIF-1 $\alpha$  and display HIF-1 $\alpha$ -dependent inhibitory function on protective Th1 responses. Moreover, HIF-1 $\alpha$  limits their leishmanicidal functions and regulates the differentiation and output of inflammatory monocytes from the bone marrow.

#### Results

1. Myeloid cells, particularly Ly6C<sup>hi</sup> and Ly6C<sup>lo/int</sup> monocytes, accumulate in the spleen of *L. donovani* infected mice over the course of infection.

The literature about the role of monocytes during experimental visceral leishmaniasis is scarce. Hence, we wanted to have a full picture of the monocytes and neutrophils recruitment kinetics to the spleen over the course of experimental *L. donovani* infection, before assessing the role of HIF-1 $\alpha$  in splenic myeloid cells. We first monitored the frequency of CD11b<sup>hi</sup> Ly6G<sup>hi</sup> neutrophils. As shown in Figure 1A, the percentage of neutrophils present in the spleen gradually increased during the first 4 weeks of infection. Similarly to neutrophils, Ly6C<sup>hi</sup> monocytes were increasingly recruited to the spleen over the course of infection (Fig. 1B). In contrast, the frequency of Ly6C<sup>lo/int</sup> monocytes did not vary substantially as disease progressed (Fig. 1B). Interestingly, the two monocyte populations were less easily distinguishable during the chronic phase of infection.

We next examined whether splenic myeloid cells expressed CD11c at various time points of infection. At d14 p.i. about 55% of all CD11b<sup>+</sup> cells in the spleen expressed CD11c; the percentage of CD11c<sup>+</sup> cells increased over the course of infection and at d35p.i. 80% of the splenic CD11b<sup>+</sup> cells were also CD11c<sup>+</sup> (Fig. 1C). As expected, all Ly6C<sup>hi</sup> monocytes were CD11c<sup>+</sup> and about 85% of the Ly6C<sup>lo/int</sup> monocytes expressed CD11c (Fig. 1D).

Because LysM-specific HIF-1 $\alpha$ -deficient mice are not a good model to study the role of HIF-1 $\alpha$  in monocytes/macrophages in the spleen [19] and the vast majority of splenic CD11b<sup>+</sup> cells during VL were CD11c<sup>+</sup>, we decided to use CD11c-specific HIF-1 $\alpha$  deficient mice [5] to investigate the role of HIF-1 $\alpha$  in myeloid cells, particularly monocytes, during chronic VL. To

note, neutrophils did not express CD11c, hence they are HIF-sufficient in both groups of mice.

## HIF-1α- deficient mice in CD11c<sup>+</sup> cells show increased frequency and numbers of inflammatory monocytes in the spleen.

We have previously reported that  $Hif^{flox/flox} - Cdllc-Cre^+$  mice are highly resistant to L. donovani infection ([5] and S1A Fig.). During the acute phase of infection, HIF-1 $\alpha$  impairs dendritic cell functions and limits CD8 T cell expansion [5]. At this stage of disease, parasite clearance in these mice is mainly CD8 T cell-dependent [5]; however, it is still unclear how these mice control L. donovani growth during chronic VL, when CD8 T cells are exhausted [20]. CD8<sup>+</sup> dendritic cells are thought to be responsible for CD8 T cell cross-priming [21]. These DC subpopulation, unlike CD4<sup>+</sup> DCs, mainly expresses DNGR1 (S1B Fig.) and thus directly descends from DC precursors rather than being monocyte-derived [22]. Hence, we decided to extend our investigation on the role of HIF-1 $\alpha$  to other myeloid cells, particularly monocytes and monocytes-derived cells. Because monocytes contribute to parasite clearance in other models of leishmaniasis [16-18], we first compared the recruitment of monocytes to the spleen in Hif<sup>lox/flox</sup> - Cd11c- $Cre^+$  mice (HIF-1 $\alpha$ -deficient) and their  $Cre^-$  littermates (HIF-1 $\alpha$ -sufficient) at various time points of infection. Before, though, we monitored HIF-1 $\alpha$  expression in purified CD11b<sup>+</sup> cells from both mouse groups to confirm that HIF-1 $\alpha$  was indeed deleted in  $Hif^{lox/flox} - Cd11c$ -Cre<sup>+</sup> myeloid cells (S2 Fig.A and B). As observed in C57BL/6 mice, the frequency and the number of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes increased over the course of infection in the Cre<sup>-</sup>and Cre<sup>+</sup> group (Fig. 2A and B). However, a significantly higher number of inflammatory monocytes was present in the spleen of  $Cre^+$  mice. Non-classical Ly6C<sup>lo/int</sup> monocytes (Fig. 2A and C) and neutrophils (Fig. 2D and S3A Fig.) displayed similar frequencies in both mouse groups, but cell

numbers were higher in  $Cre^+$  mice, reflecting a slightly more pronounced splenomegaly in HIF-1 $\alpha$  conditional knockouts. Similar results were obtained when we examined F4/80 expression in myeloid cells (Fig. 2E and S3B Fig.).

Next, we further characterized splenic monocytes by monitoring the expression of CCR2 and F4/80, and MHCII on Ly6C<sup>lo/int</sup> and Ly6C<sup>hi</sup> cells. 85% of Ly6C<sup>hi</sup> monocytes co-expressed CCR2 and F4/80 at d14 and 21p.i.; the frequency then decreased to 50% at later time points of infection (Fig. 2F and S4A Fig.). No differences were observed between HIF-1 $\alpha$ -sufficient and deficient monocytes. The frequency of CCR2<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Ly6C<sup>lo/int</sup> monocytes steadily increased over the course of infection to reach a plateau of about 70% at d21p.i. (Fig. 2F and S4B Fig.) in both groups of mice. These monocytes possibly represent an intermediate stage in the differentiation process towards macrophages.

Surprisingly, 50% of *Cre*<sup>-</sup>Ly6C<sup>hi</sup> monocytes were positive for MHCII; by d21p.i., the frequency of MHCII<sup>+</sup> inflammatory monocytes increased to 80-90% and was maintained at this level during chronic infection (Fig. 2G and S4C Fig.). The percentage of MHCII<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> monocytes was slightly higher in HIF-1 $\alpha$ -deficient mice at d14, d28, and d35p.i.. Recently, Ly6C<sup>hi</sup> monocytes with a regulatory phenotype have been described [23]. These monocytes are induced by IFN $\gamma$  in the bone marrow and express MHCII and Sca-1. Hence, we assessed Sca-1 expression on monocytes. From d21 p.i. on, the majority of the Ly6C<sup>hi</sup> monocytes expressed Sca-1, suggesting that inflammatory monocytes may also display a regulatory phenotype during chronic VL (Fig. 2H).

Based on our surface marker analysis, splenic monocytes resembled monocytic myeloid-derived suppressor cells (M-MDSC) [24] and/or monocyte with a regulatory phenotype [23]. The other

known subset of MDSC originates from polymorphonucleated cells (PMN-MDSC) and is characterized by the co-expression of Ly6G and Ly6C (Ly6G<sup>+</sup>Ly6C<sup>lo</sup>) [24].To determine whether PMN-MDSC were also present in the spleen of *L. donovani* infected mice, we monitored the surface expression of Ly6C on CD11b<sup>hi</sup>Ly6G<sup>hi</sup> neutrophils. 100% of the neutrophils were Ly6C<sup>+</sup> already at d14p.i. (Fig. 2I and S4D Fig.); Ly6C expression was maintained during the chronic phase. This suggests that neutrophils express similar markers to PMN-MDSC and could potentially exhibit immune suppressive properties.

# 3. HIF-1α induces an M2-like phenotype and limits leishmanicidal capacity in myeloid cells.

In the following, we sought to characterize myeloid cell function. To this end, CD11b<sup>+</sup> cells were purified from the spleen of infected *Cre*<sup>-</sup> and *Cre*<sup>+</sup> mice at various time points of infection; the expression of several genes was assessed by qPCR. Interestingly, CD11b<sup>+</sup> cells from *Hif*<sup>flox/flox</sup> – *Cd11c-Cre*<sup>+</sup> mice showed a lower expression of TNF (Fig. 3A), arginase (Fig. 3B), Fizz1 (Fig. 3C), Mgl1, and Mgl2 (Fig. 3D and E); in contrast, they expressed higher iNOS mRNA levels (Fig. 3F). Hence, HIF-1 $\alpha$  seems to sustain the differentiation towards the M2-like macrophage subtype.

Between d14 and 21 p.i., splenic stromal cells are killed by excessive TNF production [25]; consequently, the splenic microarchitecture is altered [26]. Disruption of the microarchitecture is typically accompanied by the progressive loss of B cell Germinal Centers [27]. Interestingly, the splenic microarchitecture in infected  $Cre^+$  mice appeared to be more intact than in the *Cre*-controls at d28 p.i. (Fig. 3G). This may be a consequence of the lower TNF production by

myeloid cells (Fig. 3A). Notably, myeloid cells (Fig. 3G, blue) were increasingly present in the splenic red pulp of infected mice after d14 p.i..

HIF-1a has been reported to promote iNOS expression [28-30]. Hence, we were surprised to observe an increase in iNOS mRNA levels in myeloid cells from infected  $Cre^+$  mice (Fig. 3F). To verify our in vivo observation, we infected HIF-1a-sufficient and deficient bone marrowderived macrophages (BMM) with L. donovani amastigotes and analyzed iNOS production by flow cytometry. CD38 was used as an M1 marker. As expected, stimulation of BMM with IFNy increased the percentage of CD38<sup>+</sup> cells (Fig. 4A and B) and the production of iNOS (Fig. 4A and C), which was slightly higher in HIF-1a-deficient cells. In contrast, treatment with IL-4 failed to promote iNOS (Fig. 4C) and reduced the frequency of CD38<sup>+</sup> cells (Fig. 4B), independently from the presence or absence of HIF-1a. However, when we infected BMM with L. donovani amastigotes, a dramatic increase in iNOS production was observed in HIF-1a deficient BMM but not in HIF-1a sufficient cells (Fig. 4A and C), confirming our in vivo observation (Fig. 3F). We also analyzed the expression of M2 markers Arg-1 (Fig. 4D), Fizz-1 (Fig. 4E), and IL-10 (Fig.4F). No major differences were noticed in the levels of Arg-1 and Fizz-1 mRNA between  $Cre^+$  and  $Cre^-$  cells; however, IL-10 mRNA was not upregulated in HIF-1 $\alpha$ deficient BMM following infection with L. donovani. To be sure that HIF-1 $\alpha$  was indeed deleted in BMM from conditional knockouts, we assessed the expression of HIF-1 $\alpha$  and two HIF-1 $\alpha$ downstream targets, Pgk-1 and Glut-1 in cytokine-treated and infected BMM. HIF-1a (Fig. 4G), Pgk-1 (Fig. 4H) and Glut-1 (Fig. 4I) were not induced in HIF-1α deficient BMM following L. donovani infection or cytokine treatment, suggesting that recombination occurred in BMM from  $Cre^+$  mice.

Because HIF-1 $\alpha$  is known to regulate cell metabolism, we next measured intracellular lactate (Fig. 5A) and glucose levels (Fig. 5B). Interestingly, HIF-1 $\alpha$ -sufficient myeloid cells had a higher intracellular lactate concentration compared to HIF-1 $\alpha$ -deficient cells (Fig. 5A), reflecting the metabolic switch towards anaerobic glycolysis [31, 32]. *Cre*<sup>-</sup> cells also displayed a slightly higher intracellular glucose concentration (Fig. 5B). We also assessed the production of reactive oxygen species (ROS), which are typically not generated by M2 macrophages [32]. HIF-1 $\alpha$  – deficient splenocytes expressed higher levels of ROS (Fig. 5C and S5A Fig.). Neutrophils (Fig. 5D and S5B fig.) and inflammatory monocytes (Fig. 5E and S5C Fig.) lacking HIF-1 $\alpha$  contributed to this difference.

To rule out the possibility that myeloid cells acquired an M2-like phenotype because of higher levels of IFN $\gamma$  present in the environment, we assessed the expression of the INF $\gamma$  receptor by FACS. As shown in Figure 5F, the frequency of CD11b<sup>hi</sup>Ly6C<sup>+</sup> cells expressing IFN $\gamma$ R was similar in both groups of mice, with exception of d21 p.i., when the expression was lower in *Cre*<sup>+</sup> mice.

Taken together, these results suggest that HIF-1 $\alpha$  may be involved in the differentiation towards macrophages with an M2-like phenotype, which is unable to kill *Leishmania* [31, 33].

#### 4. HIF-1α enhances the inhibitory functions of myeloid cells during chronic VL.

We next investigated the inhibitory potential of splenic myeloid cells.  $CD11b^+$  cells were purified from the spleen of *L. donovani* infected mice at d14 and 28 p.i. and co-cultured at a 1:1 ratio with naïve CD4 T cells stimulated with plate-bound anti-CD3and with anti-CD28 and rIL-12. Myeloid cells purified from infected *Cre<sup>-</sup>* mice at d14 p.i. only slightly inhibited the differentiation towards IFN $\gamma$ -producing CD4 T cells (Fig. 6A and B); a similar result was obtained with HIF-1 $\alpha$ -deficient myeloid cells purified at the same time. Remarkably, d28 p.i. CD11b<sup>+</sup> cells from infected HIF-1 $\alpha$  sufficient mice strongly inhibited Th1 differentiation (Fig. 6A and B); a significantly lower degree of inhibition was observed in samples containing d28 p.i. HIF-1 $\alpha$ -deficient myeloid cells.

Taken together, our results suggest that myeloid cells purified during chronic infection inhibit T cell responses, implying that these cells are phenotypically and functionally similar to MDSC. This inhibitory function requires HIF-1 $\alpha$ . Thus, this transcription factor is not only involved in attenuating the leishmanicidal capacity of myeloid cells, but also in enhancing their inhibitory function.

## 5. HIF-1α deficient intermediate stage monocytes are more resistant to *L. donovani* infection under hypoxic conditions.

To determine whether HIF-1 $\alpha$ -deficient monocytes were more resistant to infection by *L*. *donovani*, we infected bone marrow-derived monocytes in vitro with fluorescently labelled amastigotes and monitored the infection for 24h by FACS and Image Stream. Monocytes were either activated or not with IFN $\gamma$  2h prior to infection; cells were kept under hypoxic conditions at all time to mimic the bone marrow [34] and the splenic environment (S6A Fig.). We first confirmed that  $Cre^+$  cells had a reduced HIF-1 $\alpha$  expression (S6B Fig.). About 25-30% of HIF-1 $\alpha$ –sufficient Ly6C<sup>hi/int</sup> monocytes contained parasites after 12h of infection; at 24h, 40-45% of the cells harbored parasites (Fig. 7A). Interestingly, when monocytes were exposed to IFN $\gamma$  prior to infection, the percentage of parasitized cells dramatically increased to 60% at 12h and 80% at 24h of infection (Fig. 7A and S6C Fig.). This is probably due to the fact that IFN $\gamma$  induces regulatory Ly6C<sup>hi/int</sup> monocytes [23] and that these may be more permissive for *L. donovani* amastigotes. In contrast, HIF-1 $\alpha$ -deficient inflammatory monocytes were significantly less parasitized at 12 and 24h in the absence of IFN $\gamma$  (Fig. 7A and S6C Fig.); as for their HIF-1 $\alpha$ -sufficient counterparts, the addition of IFN $\gamma$  dramatically increased the rate of infection (Fig. 6A), suggesting that HIF-1 $\alpha$  is not involved in inducing regulatory monocytes. Nevertheless, IFN $\gamma$ -pulsed HIF-1 $\alpha$ -deficient Ly6C<sup>hi/int</sup> monocytes were slightly more resistant to infection than wild type inflammatory monocytes. Similar results were obtained when we analyzed the degree of infection of Ly6C<sup>lo</sup> monocytes (Fig. 7B and S6D Fig.). We next determined whether the number of parasites per cell was equal in both groups of mice using the ImageStream technology (examples of analysis are depicted on Fig. 7C). As shown in Figure 7D and E, no major differences were observed in the percentage of cells harboring various numbers of parasites between HIF-1 $\alpha$ -deficient and HIF-1 $\alpha$ -sufficient monocytes.

Because HIF-1 $\alpha$  is upregulated during the differentiation of monocytes to macrophages [35], we were intrigued to know whether HIF-1 $\alpha$  would play a role in resistance/susceptibility to infection if we kept M-CSF in the medium during infection with *L. donovani* to allow differentiation into macrophages. Surprisingly, we observed a highly significant reduction in the percentage of Ly6C<sup>hi</sup> cells harboring parasites in HIF-1 $\alpha$ -deficient monocytes (Fig. 7F and S7A Fig.), independently whether they were pulsed or not with IFN $\gamma$ . Similar results were obtained when we analyzed the rate of infection in Ly6C<sup>lo/int</sup> monocytes (Fig. 7G and S7B Fig.). Because *Leishmania* amastigotes survival in macrophages is not impaired in the absence of HIF-1 $\alpha$  [5, 36], this suggests that HIF-1 $\alpha$  mainly increases the susceptibility to infection of transitional forms of monocytes/macrophages.

## 6. CD11c-specific HIF-1α-knockout mice produce more monocyte's progenitors and display enhanced output of inflammatory monocytes in the bone marrow.

Because our myeloid cells resembled MDSC and MDSC are derived from the myeloid lineage and are a result of altered hematopoiesis during cancer or chronic infections, we next investigated myeloid progenitors and granulocyte and monocyte differentiation in the bone marrow of L. donovani infected mice. Steady state bone marrow myeloid progenitors were gated as negative for all lineage markers, positive for c-kit and negative for Sca-1; they were then subdivided according to the expression of CD41, CD150, CD16/32 to define granulocytemonocyte progenitors (GMP) as CD16/32<sup>hi</sup> CD150<sup>-</sup> cells (Fig.8A, left panels). Interestingly, along with the increase in hematopoietic stem progenitor cell (HSPCs) expansion, we detected a shift in Sca-1 expression on HSPCs (Fig. 8A, right panels). In order to include emergency GMPs, known as Sca-1<sup>+</sup> GMPs [37], GMPs were identified as Sca-1<sup>+/-</sup>Lin-c-Kit<sup>+</sup>CD16/32<sup>hi</sup>CD150<sup>-</sup> CD41<sup>-</sup> (Fig. 8A, right panels). In agreement with our observations in the spleen, HIF-1α conditional knockout mice had a higher frequency and numbers of GMPs (Fig. 8B) at day 28 and 35 p.i.. This was paralleled by a significantly enhanced output of granulocytes at d35 p.i. (Fig. 8C) and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes (Fig. 8D) at day 28 and 35 p.i.. No differences were observed for the Ly6C<sup>lo/-</sup> monocytes (Fig. 8E). It is important to note that the granulocyte and monocyte output does not increase during the first 3 weeks of L. donovani infection, suggesting that the bone marrow, like the spleen, does not majorly react to the infection during the acute phase.

To assess possible differences in the capacity to exit the bone marrow between monocytes from  $Hif^{flox/flox}-Cd11c-Cre^+$  and  $Cre^-$  mice, we monitored CCR2 and CXCR4 expression. No differences were found between both groups of mice (Fig. 8F and G). When we monitored the

surface expression of Sca-1 and MHCII, we could not find any difference in terms of percentage and intensity of Sca-1 expression (Fig. 8H). A similar result was obtained when we assessed MHCII expression (Fig. 8I), suggesting that the inflammatory stimuli received by Ly6C<sup>hi</sup> monocytes were similar in both groups of mice. To note, Sca-1 expression increased at d21 p.i. to peak at d28p.i. and gradually decreased thereafter (Fig. 8H), showing a different expression kinetics than on splenic Ly6C<sup>hi</sup> monocytes (Fig. 2H).

#### 7. HIF-1 $\alpha$ expression in CD11c<sup>+</sup> cells exacerbates infection in the bone marrow.

HIF-1 $\alpha$  CD11c-conditional knockouts are highly resistant to *L. donovani* infection in the spleen ([5] and S1 Fig.), but the hepatic parasites number does not significantly differ from that of the control mice [5]. Hence, we were curious to assess the parasite burden in the bone marrow of our HIF-1 $\alpha$  conditional knockouts. In agreement with the literature [38], we observed a dramatic increase in the number of parasite after 3 weeks of infection in the *cre*<sup>-</sup> control group (Fig. 9). The parasite burden peaked at d28 p.i. in *Cre*<sup>+</sup> mice as well, but to a lesser extent. Indeed, we observed more than 50% reduction in conditional knockout mice, suggesting that HIF-1 $\alpha$  expression in CD11c<sup>+</sup> cells is detrimental to the outcome of *L. donovani* infection in the bone marrow as well.

#### Discussion

The hematopoietic system rapidly increases myeloid cell output to fight pathogens. Emergency myelopoiesis also occurs during visceral leishmaniasis (BMA, KMH et al., manuscript submitted). Our study shows that emergency myelopiesis in the context of VL results in the generation of regulatory monocytes that are more permissive to *Leishmania* parasites. Moreover, myeloid cells acquire an MDSC-like phenotype in the spleen and display HIF-1 $\alpha$ -dependent T cell inhibitory functions. HIF-1 $\alpha$  also drove the polarization towards M2-like macrophages and rendered intermediate stage monocytes more susceptible to *L. donovani* infection. Our results suggest that HIF-1 $\alpha$  largely contributes to the establishment of chronic *Leishmania* infection by enhancing immunosuppressive functions and lowering leishmanicidal capacity of myeloid cells.

During experimental VL, myeloid cell generation is enhanced in the bone marrow by a parasiteinduced boost in GM-CSF production [39]; extramedullary myelopoiesis in the spleen is also dramatically increased [38]. We observed a significant increase in GMPs in the bone marrow, which mainly resulted in a selective enhanced output of  $Ly6C^{hi}$  monocytes (see also BMA, KMH et al., manuscript submitted). Interestingly, inflammatory monocytes started upregulating Sca-1 and MHCII, two markers associated with regulatory monocytes [23], at day 21 after infection. In *L. donovani* infected mice, CD4<sup>+</sup> Th1 responses typically peak between day 21 and 28 of infection. Hence, it is possible that Th1 cells prime Ly6C<sup>hi</sup> monocytes for regulatory functions in the bone marrow. It is not surprising, thus, that IFNγ-primed monocytes are more permissive to in vitro *L. donovani* infection. Acquisition of regulatory functions was not dependent on HIF-1 $\alpha$ , since  $Hif^{flox/flox} - CD11c$ -Cre<sup>-</sup> monocytes showed a similar infection rate to Cre<sup>+</sup> cells. HIFdependent inhibitory functions were first acquired during differentiation into macrophages. Adaptation to hypoxia in human monocytes was shown to be governed by NF&B1 and not HIF-1 $\alpha$  [40]. However, during the differentiation towards macrophages, HIF-1 $\alpha$  translocates from the cytosol to the nucleus, changing therefore the adaptation mechanism to hypoxic conditions [40]. This may also apply to IFN $\gamma$ -primed mouse monocytes. Hence, *Leishmania* induces an increased output of inflammatory monocytes in the bone marrow that acquire HIF-1 $\alpha$ -independent regulatory functions prior to egress and represent therefore "safe targets" for the parasite, as postulated by an early study by Mirkovich et al. [13].

Increased rate of medullary or extramedullary myelopoiesis often leads to the induction of MDSC. MDSC are a heterogeneous population of various intermediate stages of myeloid cell differentiation that are best defined by their characteristic T cell-inhibitory activity. Based on the current classification [24], the majority of our splenic CD11b<sup>+</sup> cells were phenotypically similar to Mo-MDSC and PMN-MDSC for the Ly6G<sup>hi</sup>Ly6C<sup>+</sup> neutrophils. Mo-MDSC-like markers were expressed by most of the Ly6C<sup>hi</sup> and Ly6C<sup>lo/int</sup> monocytes, suggesting that these two splenic populations represent a mixture of various intermediate differentiation stages. MDSC have been best studied in the context of cancer, where they are known to inhibit T cell proliferation and/or function [24, 41, 42]. Recent literature, however, highlights their role in parasitic diseases as well [43]. *Heligmosomoides polygyrus*, for instance, induces MDSC capable of suppressing Th2 cell proliferation and IL-4 secretion, promoting therefore chronic infection [44]. In contrast, during experimental *L. major* infection, MDSC appear to be required for protective immunity even if they inhibit Th1 cell proliferation [45]; surprisingly, in this model, MDSC effector functions

seem to be mouse-strain specific [46]. Our results indicate that myeloid cells purified from *L. donovani* infected mice at day 28 post infection are rather inhibitory. Indeed, they are able to significantly reduce IFN $\gamma$  production of anti CD3/CD28-stimulated CD4 T cells. Interestingly, cells purified at day 14 post infection, before they acquire a MDSC-like phenotype, didn't display any suppressive effect. At this time point of infection, mice have not yet developed severe splenomegaly, the splenic architecture is still intact [47], and HIF-1 $\alpha$  expression in myeloid cell is very low (S2A and B Fig.). This suggests that the splenic environment further shapes myeloid cell's function to acquire inhibitory competence during the chronic phase of infection.

Suppression of Th1 cells was dependent upon HIF-1 $\alpha$  expression. In fact, HIF-1 $\alpha$ -deficient MDSC only displayed minor inhibitory functions even when purified from chronically infected mice. HIF-1 $\alpha$  is known to enhance MDSC differentiation and effector functions in tumor immunology [4, 48]. MDSC mediate suppression through various mechanisms, such as upregulation of PD-L1, induction of IL-10, secretion of NO or ROS, or increased arginase activity [24]. In our model, we do not know what is responsible for suppressing Th1 responses. NO has been reported to inhibit T cell proliferation during *L. major* and *H. polygyrus* infections. In our case, HIF-1 $\alpha$ -deficient MDSC-like cells expressed higher *Inos* mRNA levels than HIF-1 $\alpha$ -sufficient, yet their inhibitory functions are significantly attenuated. Moreover, we didn't see a substantial difference in IL-10 expression between  $Cre^+$  and  $Cre^-$  cells, suggesting that IL-10 may not play a major role. However, arginase expression was downregulated in HIF-1 $\alpha$ -deficient myeloid cells compared to their HIF-1 $\alpha$ -sufficient counterpart. In human cutaneous leishmaniasis, increased arginase activity has been associated to chronic infections [49, 50]; in
these studies, neutrophils were the enzyme's main source. Moreover, parasite-derived arginase was reported to contribute to the regulation of CD4 T cell exhaustion during experimental *L. major* infection [51]. It is thus possible that arginase may play a role in our model as well. Further investigations are needed to characterize the mechanism of suppression of MDSC-like myeloid cells in experimental VL.

Myeloid cells during *L. donovani* infection not only possess inhibitory capacities, but have also a propensity to be more permissive to *L. donovani* infection. Indeed, we found elevated mRNA levels for markers typically associated with the M2 macrophage phenotype, which is unable to kill the parasite [33]. Interestingly, HIF-1 $\alpha$  conditional knockouts expressed significantly lower mRNA for M2-like markers during chronic experimental VL, suggesting that HIF-1 $\alpha$  plays a major role in the induction of a M2-like phenotype. In a Lewis lung carcinoma model, polarization of tumor associated macrophages towards an M2-like phenotype was dependent on HIF-1 $\alpha$  induced by tumor-derived lactic acid, a by-product of glycolysis [3]. In our model, splenocytes from infected *Hif* flax/flax-*Cd11c-Cre*<sup>-</sup> mice showed significantly higher intracellular lactate concentrations compared to *Cre*<sup>+</sup> mice. It is thus possible that lactate contributes to HIF-1 $\alpha$  stabilization in our model as well. We also noticed a lower glucose concentration in HIF-1 $\alpha$ -deficient splenocytes. This may reflect a higher metabolic activity or a decreased capacity to import glucose into the cell, since HIF-1 $\alpha$  induces the glucose transporter Glut-1expression [52].

Although our results are in agreement with Colegio et al [3], other groups have shown that HIF-1α promotes NOS2 in myeloid cells [28-30, 36] and is associated with M1-like macrophages. This discrepancy may be a reflection of the environment and the stimuli responsible for the stabilization of HIF-1 $\alpha$  within the cells. In some infection models or in vitro experiments, HIF- $1\alpha$  appears to be mainly expressed by M1-like macrophages and to promote pathogen clearance [28, 30, 36, 53]; while in models of chronic inflammation, HIF-1 $\alpha$  has a more immunosuppressive role [3, 48]. Under normoxic conditions, this transcription factor can be induced by inflammatory cytokines, TLR agonists, or directly by pathogens [54, 55] [8, 29, 56, 57]. In contrast, chronically inflamed tissues are generally hypoxic, acidic, hypoglycemic, and full of free oxygen radicals [58, 59]. Thus, depending on the model, HIF-1 $\alpha$  stabilization occurs through very different pathways and this could lead to different outcomes. In our model, ex-vivo purified myeloid cells expressed higher iNOS mRNA levels in the absence of HIF-1 $\alpha$ . This was not due to a compensatory upregulation of HIF-2 $\alpha$ , which was only transiently higher at d14 p.i. in HIF-1a-deficient myeloid cells (S8 Fig.). These results were confirmed using in vitro infection of BMM. Indeed, L. donovani strongly induced iNOS in HIF-1 $\alpha$  deficient BMM, suggesting that this enzyme's regulation in BMM may be manipulated by the parasite and that HIF-1 $\alpha$  is somehow involved. However, the interpretation of these results could be tainted by the fact that some cells may escape recombination and that the interaction of HIF-1 $\alpha^+$  and HIF-1 $\alpha^-$  cells may play a role in the total iNOS induction. Further investigations are definitely warranted to better understand iNOS regulation in L. donovani infected monocytes/macrophages and the role HIF- $1\alpha$  may have in this process.

Despite the fact that HIF-1 $\alpha$  is involved in promoting endothelial cell proliferation [60] and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes contribute to red pulp vasculature remodelling [61], this transcription factor doesn't seem to be the major player in tissue neovascularization and splenomegaly in experimental VL. Indeed, CD11c-HIF-1 $\alpha$  conditional knockout and HIF-sufficient animals developed similar levels of splenomegaly and myeloid cells from both group of mice expressed similar levels of vascular endothelial growth factor (VGEF) mRNA.

To conclude, our results demonstrate that emergency myelopoiesis following *L. donovani* infection results in the output of monocytes primed in the bone marrow to acquire regulatory functions in a HIF-1 $\alpha$ -independent manner. Once monocytes reach the spleen and start differentiating into macrophages or dendritic cells, the chronically inflamed splenic environment induces the stabilization of HIF-1 $\alpha$ , which is then taking control over their functions. HIF-1 $\alpha$  is responsible for the acquisition of MDSC-like functions by myeloid cells, and for lowering their leishmanicidal capacity. Because myeloid cell can also be produced locally in the spleen, it would be interesting to compare the function of bone marrow and splenic-derived monocytes. Finally, our study demonstrates how *L. donovani* exploits a physiological response to hypoxia to establish persistent infection.

## **Material and Methods**

#### Mice and parasites

C57BL/6-Tg(OT-I)-RAG1<sup>tm1Mom</sup> mice were purchased from The Jackson Laboratory. Conditional *Hif-1a* knock-out in CD11c<sup>+</sup> cells were generated as previously described [5]. All mice were housed at the INRS animal facility under specific pathogen-free conditions and used at 6–10 weeks of age.

*Leishmania donovani* (strain LV9) was maintained by serial passage in B6.129S7-*Rag1*<sup>tm1Mom</sup> mice, and amastigotes were isolated from the spleens of infected animals. *Hif-1a Cd11c-Cre*<sup>+</sup> mice and their littermates *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>-*Cd11c-Cre*<sup>-</sup> were infected by injecting  $2\times10^7$  amastigotes intravenously via the lateral tail vein. Splenic parasite burdens were determined by examining methanol-fixed, Giemsa stained tissue impression smears [5]. Bone marrow parasite burden were calculated by limiting dilutions [5]. Data are presented as number of parasites present in the bone marrow of one femur and one tibia or as Leishman Donovan Units (LDU).

#### **Ethics statement**

Experiments were carried out under protocols approved by the Comité Institutionel de Protection des Animaux of the INRS-Institut Armand-Frappier (1602-02, 1510-02). These protocols respect procedures on good animal practice provided by the Canadian Council on animal care.

### **Flow cytometry**

Myeloid cell responses in infected mice were analyzed by flow cytometry. Fc receptors were blocked by adding supernatant of 2.4G2-producing hybridomas for 5 min at 4 °C to block to the homogenized splenocytes. Cells were then washed with FACS buffer and stained with the following antibodies: anti-MHCII FITC conjugated, anti-CD11c-APC (BD Biosciences), anti-CD11b Pacific Blue (PB), anti-Ly6C-Percp, anti-Ly6G-PE (Biolegend), anti-F4/80-PE-Cy7 (eBioscience), anti-IFNyR (eBioscience), and anti-CCR2-Alexa Fluor 700 (R&D Systems). The bone marrow (BM) was harvested by flushing tibias and femurs from the hind limbs in phosphate-buffered saline (PBS). Cells were passed through 25-gauge needles to obtain single cell suspensions. Single cell suspensions were prepared in PBS containing 0.1% bovine serum albumin (BSA) and 0.5mM ethylene-diamine-tetra-acetic acid (EDTA). To analyze adult BM progenitor cell populations, biotin-conjugated anti-lineage mAbs anti-CD3e (145-2C11), anti-CD11b (M1/70), anti-CD45/B220 (RA3-6B2), anti-Gr1 (RB6-8C5), and anti-Ter119 were used as the lineage mix. For secondary detection streptavidin conjugated to Brilliant Violet-500 was used. The hematopoietic stem progenitor cell (HSPC) population was analyzed by staining with PE anti-CD117 (c-Kit, 2B8; BD-Biosciences) and PE-Cy7 anti-Sca-1 (Ly6A/E, D7; BD-Biosciences) in addition to the lineage mix. Granulocyte-monocyte progenitor GMPs, were determined by staining with PE anti-CD41 (eBioscience), PerCP-Cy5.5 anti-CD16-32 (Biolegend) and Alexa-Fluor 647 anti-CD150 (TC15, BD Biosciences. 300,000 events were acquired on a BD LSRFortessa<sup>TM</sup> cell analyzer (Becton Dickinson); analysis was performed using the FlowJo and/or FACSDiva software.

The expression of Total Reactive Oxygen Species (ROS) from infected mice was assessed using the (ROS) Assay Kit 520 nm kit (eBiosciences) following manufacturer's instructions (catalogue number, 88-5930-74). In order to characterize ROS production in myeloid cell subpopulations, the antibodies previously described were added after fixation with 2% paraformaldehyde (PFA). Cells were acquired with a BD LSRFortessa<sup>TM</sup> cell analyzer (Becton Dickinson).

Detection of hypoxia in the spleen of infected and naïve mice was performed using the Hypoxyprobe-RedAPC kit (Hypoxyprobe Inc., Burlington, MA) following manufacturer's instructions. Cells were acquired with a BD LSRFortessa<sup>TM</sup> cell analyzer (Becton Dickinson).

#### **Real-time PCR analysis**

Real-time PCR (Stratagene mx3005p Real time PCR System) was used to analyze transcripts levels of HIF-1α, HPRT [5], TNF [62], Arg1, Fizz1, Mgl1, Mgl2 [3], and iNOS [63]. Total RNA was isolated using RNeasy (Qiagen) to perform real-time RT-PCR. cDNA was prepared using 500 ng of total RNA using High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Bio Rad). Real time PCR was performed using standard cycle of amplification. Primers used to determine the relative gene fold expression by quantitative PCR (qPCR) are shown in Supplemental Table1.

#### In vitro bone marrow derived macrophage polarization and L. donovani infection

Macrophages were derived from the bone marrow of naïve mice in IMEM medium (Life Technologies) supplemented with 10% FBS, pen/strept, L-glutamine, and 15% L929 cell-conditioned medium as a source of colony-stimulating factor-1 (CSF-1). Cells were then left for 6 days at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. For one set of experiments, BMM were washed and resuspended in supplemented DMEM. Cells were classically activated (M1) with 20 ng/ml of

murine IFNγ (Peprotec), alternatively activated (M2) with 20 ng/ml of murine IL-4 (Peprotec), or infected with *L. donovani* amastigotes at a MOI of 1:10. BMM were then incubated for 24h and stained with anti-CD11b-BV421, iNOS-APC (Biolegend), and CD38-BV711 (eBioscience) or processed for qPCR analysis. Samples were acquired on a BD LSRFortessa cell analyzer (Becton Dickinson).

#### Determination of lactate and glucose concentration

A million splenocytes from infected mice were washed with PBS and lysed with RIPA buffer (Sigma, catalogue number R0278-50). Intracellular lactate and glucose concentrations were measured using respectively a Lactate Assay Kit and Glucose Assay Kit (BioVision) as per manufacturer's instructions. Samples were prepared as triplicates for the colorimetric lactate assay. The absorbance was measured at 570 nm using an xMark<sup>TM</sup> microplate absorbance spectrophotometer (BioRad) immediately after preparation.

### **CD4<sup>+</sup> T cells inhibition test**

Splenic CD4<sup>+</sup> T cells were enriched from naïve mice using magnetic cell sorting (MACS) following manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec). The purity comprised between 90-95%. CD11b<sup>+</sup> cells were purified using MACS from spleens of infected and naïve mice previously digested with collagenase D; the purity of the samples was 80-90%. Microtest 96 well plates (Sarstedt) were coated with/without 200µl of PBS containing 1 µg/ml anti-mouse CD3 (eBiosiences) and incubated for 90 min at 37°C. Plates were then washed twice with PBS and equilibrated for 15 min at 37 °C with 100µl per well of RPMI-1640 medium (Life technologies), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), pen/strep and L-glutamine. Th1 polarization

was induced as follows: CD4<sup>+</sup> T cells were seeded at  $2 \times 10^5$ /well in anti-CD3-coated 96-well plates with anti-CD28 (2 µg/ml), rIL-12 (30 ng/ml), and rhIL2 (0.5 µg/ml) (eBiosciences). CD11b<sup>+</sup> cells enriched as described above were added or not to the culture at a 1:1 ratio. Cells were then incubated at 37 °C in a 5 % CO<sub>2</sub> incubator and 5 days later stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)/ionomycin in the presence of Brefeldin A (BD Biosciences). Production of IFN $\gamma$  was analyzed by FACS using anti-CD4-FITC, anti-CD3-PB, and anti-IFN $\gamma$ -APC (BD-Bioscience). 50,000 events were acquired on a BD LSRFortessa cell analyzer and analyzed using the FlowJo software.

#### Monocyte differentiation and in vitro L. donovani infection

Monocytes were derived from the bone marrow of naïve mice under hypoxia (2%) in IMEM medium (Life Technologies) supplemented with 10% FBS, pen/strept, L-glutamine, and 15% L929 cell-conditioned medium as a source of colony-stimulating factor-1 (CSF-1). Cells were then left for 3 days at 37°C in a hypoxia chamber. For one set of experiments, differentiated monocytes were washed and resuspended in supplemented DMEM without CSF-1 prior to a 2h-activation with 100 U/ml murine IFNγ (Peprotec); for another set of experiments, CSF-1 was left in the culture for the entire duration of the test. *L. donovani* amastigotes were stained with PKH67 (Sigma) following manufacturer's instructions and added at a MOI of 1:10 for 1-24h under hypoxic condition. Cells were then stained with anti-CD11b-PB, Ly6C-PerCp, and CD11c-APC acquired on a BD LSRFortessa cell analyzer (Becton Dickinson) and Image stream (Amnis).

#### Western Blot Analysis

Total cell protein extracts of CD11b<sup>+</sup> cells purified by MACS from infected and naive mice were pooled and lysed in RIPA buffer (sigma Aldrich, Germany).  $Cre^+$  and  $Cre^-$  bone marrow-derived monocytes infected with *L. donovani* amastigotes were lysed as described above. Equal amounts of protein (15 µg) were fractionated by 10% SDS-PAGE. Monoclonal anti-HIF-1 $\alpha$  antibody Hif-1 $\alpha$ 67 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA) was used for immunoblot assays. Blots were stripped and reprobed with a polyclonal antibody against  $\beta$ -actin to confirm equal protein loading [64]. Densitometric analysis was performed by spot densitometry using AlphaImager 3400 imaging software (Alpha Innotech Corporation) and normalized to  $\beta$ -actin control. Values are presented as fold induction compared to the level in naive mice.

#### Image stream flow cytometry

Monocytes were differentiated, treated, and stained as described above. After fixation with 2% PFA nucleus were stained with 4',6-diamidino-2-phénylindole (DAPI) and washed with PBS. Samples were then acquired on the ImageStreamX MarkII imaging cytometer (Amnis). The analysis was performed using the IDEAS software (Amnis).

#### Immunohistochemistry

Freshly harvested spleens were snap frozen in OCT (Electron Microsopy Sciences, Hartfield, PA, USA) and stored at -80°C. Immunohistochemistry was performed on 8-μm frozen sections.

Tissue sections were fixed in 75% acetone and 25% ethanol (v/v) for 10 min at  $-20^{\circ}$ C, rehydrated in PBS for 10 min at room temperature, and incubated for 1 hour with 5%-BSA in PBS supplemented with 2.4G2 supernatant (1:100). Slides were then incubated over night at 4°C with anti-CD11b-BV421 (BD Bioscience, 1:300), anti-B220-FITC (BioLegend, 1:500), and antiCD169-A594 (BioLegend, 1:500). Tissue sections were then washed in PBS, mounted with Fluoromount-G (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA, USA), and analyzed using a LSM780 confocal micoscope (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany).

## Statistical analysis

Statistical analysis was performed using a multi-way ANOVA or Student's t-test (only Figures 5 and 6), with p<0.05 considered significant. All experiments were conducted independently at least three times.

## Acknowledgements

We thank Dr. Cathy Vaillancourt for assistance with the hypoxia chambers and Dr. Albert Descoteaux for critical reading of the manuscript.

## References

1. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: master regulator of O2 homeostasis. Current opinion in genetics & development. 1998;8(5):588-94. Epub 1998/10/31. PubMed PMID: 9794818.

2. Semenza GL. Regulation of mammalian O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. Annual review of cell and developmental biology. 1999;15:551-78. Epub 1999/12/28. doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.551. PubMed PMID: 10611972.

3. Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, et al. Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. Nature. 2014;513(7519):559-63. Epub 2014/07/22. doi: 10.1038/nature13490. PubMed PMID: 25043024.

 Corzo CA, Condamine T, Lu L, Cotter MJ, Youn JI, Cheng P, et al. HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment.
 J Exp Med. 2010;207(11):2439-53. Epub 2010/09/30. doi: 10.1084/jem.20100587. PubMed PMID: 20876310; PubMed Central PMCID: PMC2964584.

5. Hammami A, Charpentier T, Smans M, Stager S. IRF-5-Mediated Inflammation Limits CD8+ T Cell Expansion by Inducing HIF-1alpha and Impairing Dendritic Cell Functions during Leishmania Infection. PLoS Pathog. 2015;11(6):e1004938. Epub 2015/06/06. doi: 10.1371/journal.ppat.1004938. PubMed PMID: 26046638; PubMed Central PMCID: PMC4457842.

6. Degrossoli A, Arrais-Silva WW, Colhone MC, Gadelha FR, Joazeiro PP, Giorgio S. The influence of low oxygen on macrophage response to Leishmania infection. Scand J Immunol. 2011;74(2):165-75. Epub 2011/04/27. doi: 10.1111/j.1365-3083.2011.02566.x. PubMed PMID: 21517930.

7. Mazzon M, Peters NE, Loenarz C, Krysztofinska EM, Ember SW, Ferguson BJ, et al. A mechanism for induction of a hypoxic response by vaccinia virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110(30):12444-9. Epub 2013/07/10. doi: 10.1073/pnas.1302140110. PubMed PMID: 23836663; PubMed Central PMCID: PMC3725076.

8. Spear W, Chan D, Coppens I, Johnson RS, Giaccia A, Blader IJ. The host cell transcription factor hypoxia-inducible factor 1 is required for Toxoplasma gondii growth and

survival at physiological oxygen levels. Cell Microbiol. 2006;8(2):339-52. Epub 2006/01/31. doi: 10.1111/j.1462-5822.2005.00628.x. PubMed PMID: 16441443.

9. Ng S, March S, Galstian A, Hanson K, Carvalho T, Mota MM, et al. Hypoxia promotes liver-stage malaria infection in primary human hepatocytes in vitro. Disease models & mechanisms. 2014;7(2):215-24. Epub 2013/12/03. doi: 10.1242/dmm.013490. PubMed PMID: 24291761; PubMed Central PMCID: PMC3917242.

10. Arango Duque G, Descoteaux A. Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. Current opinion in microbiology. 2015;26:32-40. Epub 2015/05/20. doi: 10.1016/j.mib.2015.04.007. PubMed PMID: 25988701.

11. Singh AK, Mukhopadhyay C, Biswas S, Singh VK, Mukhopadhyay CK. Intracellular pathogen Leishmania donovani activates hypoxia inducible factor-1 by dual mechanism for survival advantage within macrophage. PLoS One. 2012;7(6):e38489. Epub 2012/06/16. doi: 10.1371/journal.pone.0038489. PubMed PMID: 22701652; PubMed Central PMCID: PMC3373497.

12. Arena ET, Tinevez JY, Nigro G, Sansonetti PJ, Marteyn BS. The infectious hypoxia: occurrence and causes during Shigella infection. Microbes Infect. 2017;19(3):157-65. doi: 10.1016/j.micinf.2016.10.011. PubMed PMID: 27884799.

13. Mirkovich AM, Galelli A, Allison AC, Modabber FZ. Increased myelopoiesis during Leishmania major infection in mice: generation of 'safe targets', a possible way to evade the effector immune mechanism. Clinical and experimental immunology. 1986;64(1):1-7. Epub 1986/04/01. PubMed PMID: 3488146; PubMed Central PMCID: PMC1542165.

14. Passos S, Carvalho LP, Costa RS, Campos TM, Novais FO, Magalhaes A, et al. Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in Leishmania braziliensis infections. The Journal of infectious diseases. 2015;211(2):274-82. Epub 2014/08/21. doi: 10.1093/infdis/jiu439. PubMed PMID: 25139016; PubMed Central PMCID: PMC4334833.

15. Vijayamahantesh, Amit A, Kumar S, Dikhit MR, Jha PK, Singh AK, et al. Up regulation of A2B adenosine receptor on monocytes are crucially required for immune pathogenicity in Indian patients exposed to Leishmania donovani. Cytokine. 2016;79:38-44. Epub 2016/01/10. doi: 10.1016/j.cyto.2015.12.016. PubMed PMID: 26748211.

16. Leon B, Lopez-Bravo M, Ardavin C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania.

Immunity. 2007;26(4):519-31. Epub 2007/04/07. doi: 10.1016/j.immuni.2007.01.017. PubMed PMID: 17412618.

 Goncalves R, Zhang X, Cohen H, Debrabant A, Mosser DM. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of Leishmania major infection. J Exp Med. 2011;208(6):1253-65. Epub 2011/05/25. doi: 10.1084/jem.20101751. PubMed PMID: 21606505; PubMed Central PMCID: PMC3173254.

18. Novais FO, Nguyen BT, Beiting DP, Carvalho LP, Glennie ND, Passos S, et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of Leishmania braziliensis by reactive oxygen species. The Journal of infectious diseases. 2014;209(8):1288-96. Epub 2014/01/10. doi: 10.1093/infdis/jiu013. PubMed PMID: 24403561; PubMed Central PMCID: PMC3969552.

19. Abram CL, Roberge GL, Hu Y, Lowell CA. Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. Journal of immunological methods. 2014;408:89-100. doi: 10.1016/j.jim.2014.05.009. PubMed PMID: 24857755; PubMed Central PMCID: PMCPMC4105345.

20. Joshi T, Rodriguez S, Perovic V, Cockburn IA, Stager S. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against Leishmania donovani infections. PLoS Pathog. 2009;5(5):e1000431. PubMed PMID: 19436710.

21. den Haan JM, Lehar SM, Bevan MJ. CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo. J Exp Med. 2000;192(12):1685-96. PubMed PMID: 11120766; PubMed Central PMCID: PMCPMC2213493.

22. Schraml BU, van Blijswijk J, Zelenay S, Whitney PG, Filby A, Acton SE, et al. Genetic tracing via DNGR-1 expression history defines dendritic cells as a hematopoietic lineage. Cell. 2013;154(4):843-58. doi: 10.1016/j.cell.2013.07.014. PubMed PMID: 23953115.

23. Askenase MH, Han SJ, Byrd AL, Morais da Fonseca D, Bouladoux N, Wilhelm C, et al. Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. Immunity. 2015;42(6):1130-42. Epub 2015/06/14. doi: 10.1016/j.immuni.2015.05.011. PubMed PMID: 26070484; PubMed Central PMCID: PMC4472558.

24. Bronte V, Brandau S, Chen SH, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, et al. Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. Nature communications. 2016;7:12150. Epub 2016/07/07. doi: 10.1038/ncomms12150. PubMed PMID: 27381735; PubMed Central PMCID: PMC4935811.

25. Engwerda CR, Ato M, Cotterell SE, Mynott TL, Tschannerl A, Gorak-Stolinska PM, et al. A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during Leishmania donovani infection. Am J Pathol. 2002;161(2):429-37. Epub 2002/08/07. PubMed PMID: 12163368; PubMed Central PMCID: PMC1850733.

26. Engwerda CR, Ato M, Kaye PM. Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. Trends in parasitology. 2004;20(11):524-30. doi: 10.1016/j.pt.2004.08.009. PubMed PMID: 15471704.

27. Smelt SC, Engwerda CR, McCrossen M, Kaye PM. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. J Immunol. 1997;158(8):3813-21. Epub 1997/04/15. PubMed PMID: 9103448.

28. Braverman J, Sogi KM, Benjamin D, Nomura DK, Stanley SA. HIF-1alpha Is an Essential Mediator of IFN-gamma-Dependent Immunity to Mycobacterium tuberculosis. J Immunol. 2016;197(4):1287-97. doi: 10.4049/jimmunol.1600266. PubMed PMID: 27430718; PubMed Central PMCID: PMCPMC4976004.

29. Peyssonnaux C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, et al. HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. The Journal of clinical investigation. 2005;115(7):1806-15. Epub 2005/07/12. doi: 10.1172/JCI23865. PubMed PMID: 16007254; PubMed Central PMCID: PMC1159132.

30. Takeda N, O'Dea EL, Doedens A, Kim JW, Weidemann A, Stockmann C, et al. Differential activation and antagonistic function of HIF-{alpha} isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. Genes & development. 2010;24(5):491-501. doi: 10.1101/gad.1881410. PubMed PMID: 20194441; PubMed Central PMCID: PMCPMC2827844.

Galvan-Pena S, O'Neill LA. Metabolic reprograming in macrophage polarization.
Frontiers in immunology. 2014;5:420. Epub 2014/09/18. doi: 10.3389/fimmu.2014.00420.
PubMed PMID: 25228902; PubMed Central PMCID: PMC4151090.

32. Pearce EL, Pearce EJ. Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. Immunity. 2013;38(4):633-43. Epub 2013/04/23. doi: 10.1016/j.immuni.2013.04.005. PubMed PMID: 23601682; PubMed Central PMCID: PMC3654249.

33. Holscher C, Arendse B, Schwegmann A, Myburgh E, Brombacher F. Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. J Immunol. 2006;176(2):1115-21. Epub 2006/01/06. PubMed PMID: 16394000.

34. Spencer JA, Ferraro F, Roussakis E, Klein A, Wu J, Runnels JM, et al. Direct measurement of local oxygen concentration in the bone marrow of live animals. Nature. 2014;508(7495):269-73. Epub 2014/03/05. doi: 10.1038/nature13034. PubMed PMID: 24590072; PubMed Central PMCID: PMC3984353.

35. Oda T, Hirota K, Nishi K, Takabuchi S, Oda S, Yamada H, et al. Activation of hypoxiainducible factor 1 during macrophage differentiation. American journal of physiology Cell physiology. 2006;291(1):C104-13. Epub 2006/02/17. doi: 10.1152/ajpcell.00614.2005. PubMed PMID: 16481368.

36. Schatz V, Strussmann Y, Mahnke A, Schley G, Waldner M, Ritter U, et al. Myeloid Cell-Derived HIF-1alpha Promotes Control of Leishmania major. J Immunol. 2016;197(10):4034-41. doi: 10.4049/jimmunol.1601080. PubMed PMID: 27798163.

37. Buechler MB, Teal TH, Elkon KB, Hamerman JA. Cutting edge: Type I IFN drives emergency myelopoiesis and peripheral myeloid expansion during chronic TLR7 signaling. J Immunol. 2013;190(3):886-91. Epub 2013/01/11. doi: 10.4049/jimmunol.1202739. PubMed PMID: 23303674; PubMed Central PMCID: PMC3552021.

38. Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with Leishmania donovani. Infect Immun. 2000;68(4):1840-8. Epub 2000/03/18. PubMed PMID: 10722572; PubMed Central PMCID: PMC97356.

39. Cotterell SE, Engwerda CR, Kaye PM. Leishmania donovani infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. Blood. 2000;95(5):1642-51. Epub 2000/02/26. PubMed PMID: 10688819.

40. Fangradt M, Hahne M, Gaber T, Strehl C, Rauch R, Hoff P, et al. Human monocytes and macrophages differ in their mechanisms of adaptation to hypoxia. Arthritis research & therapy. 2012;14(4):R181. Epub 2012/08/09. doi: 10.1186/ar4011. PubMed PMID: 22870988; PubMed Central PMCID: PMC3580576.

41. Parker KH, Beury DW, Ostrand-Rosenberg S. Myeloid-Derived Suppressor Cells: Critical Cells Driving Immune Suppression in the Tumor Microenvironment. Advances in cancer research. 2015;128:95-139. Epub 2015/07/29. doi: 10.1016/bs.acr.2015.04.002. PubMed PMID: 26216631; PubMed Central PMCID: PMC4662416. 42. Marvel D, Gabrilovich DI. Myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment: expect the unexpected. The Journal of clinical investigation. 2015;125(9):3356-64. Epub 2015/07/15. doi: 10.1172/JCI80005. PubMed PMID: 26168215; PubMed Central PMCID: PMC4588239.

43. Van Ginderachter JA, Beschin A, De Baetselier P, Raes G. Myeloid-derived suppressor cells in parasitic infections. Eur J Immunol. 2010;40(11):2976-85. Epub 2010/11/10. doi: 10.1002/eji.201040911. PubMed PMID: 21061431.

44. Valanparambil RM, Tam M, Jardim A, Geary TG, Stevenson MM. Primary Heligmosomoides polygyrus bakeri infection induces myeloid-derived suppressor cells that suppress CD4+ Th2 responses and promote chronic infection. Mucosal immunology. 2016. Epub 2016/04/14. doi: 10.1038/mi.2016.36. PubMed PMID: 27072608.

45. Pereira WF, Ribeiro-Gomes FL, Guillermo LV, Vellozo NS, Montalvao F, Dosreis GA, et al. Myeloid-derived suppressor cells help protective immunity to Leishmania major infection despite suppressed T cell responses. J Leukoc Biol. 2011;90(6):1191-7. Epub 2011/09/22. doi: 10.1189/jlb.1110608. PubMed PMID: 21934068.

46. Schmid M, Zimara N, Wege AK, Ritter U. Myeloid-derived suppressor cell functionality and interaction with Leishmania major parasites differ in C57BL/6 and BALB/c mice. Eur J Immunol. 2014;44(11):3295-306. Epub 2014/08/22. doi: 10.1002/eji.201344335. PubMed PMID: 25142017.

47. Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. Immunol Rev. 2004;201:239-53. Epub 2004/09/14. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00188.x. PubMed PMID: 15361245.

48. Doedens AL, Stockmann C, Rubinstein MP, Liao D, Zhang N, DeNardo DG, et al. Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. Cancer research. 2010;70(19):7465-75. Epub 2010/09/16. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1439. PubMed PMID: 20841473; PubMed Central PMCID: PMC2948598.

49. Abebe T, Hailu A, Woldeyes M, Mekonen W, Bilcha K, Cloke T, et al. Local increase of arginase activity in lesions of patients with cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. PLoS neglected tropical diseases. 2012;6(6):e1684. Epub 2012/06/22. doi: 10.1371/journal.pntd.0001684. PubMed PMID: 22720104; PubMed Central PMCID: PMC3373636.

50. Mortazavi H, Sadeghipour P, Taslimi Y, Habibzadeh S, Zali F, Zahedifard F, et al. Comparing acute and chronic human cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania major and Leishmania tropica focusing on arginase activity. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV. 2016. Epub 2016/07/22. doi: 10.1111/jdv.13838. PubMed PMID: 27439742.

51. Mou Z, Muleme HM, Liu D, Jia P, Okwor IB, Kuriakose SM, et al. Parasite-derived arginase influences secondary anti-Leishmania immunity by regulating programmed cell death-1-mediated CD4+ T cell exhaustion. J Immunol. 2013;190(7):3380-9. Epub 2013/03/06. doi: 10.4049/jimmunol.1202537. PubMed PMID: 23460745; PubMed Central PMCID: PMC3737427.

52. Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A. Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. The Journal of biological chemistry. 2001;276(12):9519-25. Epub 2000/12/30. doi: 10.1074/jbc.M010144200. PubMed PMID: 11120745.

53. Werno C, Menrad H, Weigert A, Dehne N, Goerdt S, Schledzewski K, et al. Knockout of HIF-1alpha in tumor-associated macrophages enhances M2 polarization and attenuates their proangiogenic responses. Carcinogenesis. 2010;31(10):1863-72. doi: 10.1093/carcin/bgq088. PubMed PMID: 20427344.

54. Kilani MM, Mohammed KA, Nasreen N, Tepper RS, Antony VB. RSV causes HIF-1alpha stabilization via NO release in primary bronchial epithelial cells. Inflammation. 2004;28(5):245-51. PubMed PMID: 16133997.

55. Nizet V, Johnson RS. Interdependence of hypoxic and innate immune responses. Nat Rev Immunol. 2009;9(9):609-17. Epub 2009/08/26. doi: 10.1038/nri2607. PubMed PMID: 19704417; PubMed Central PMCID: PMC4343208.

56. Degrossoli A, Bosetto MC, Lima CB, Giorgio S. Expression of hypoxia-inducible factor 1alpha in mononuclear phagocytes infected with Leishmania amazonensis. Immunology letters. 2007;114(2):119-25. Epub 2007/11/07. doi: 10.1016/j.imlet.2007.09.009. PubMed PMID: 17983667.

57. Brown KM, Suvorova E, Farrell A, McLain A, Dittmar A, Wiley GB, et al. Forward genetic screening identifies a small molecule that blocks Toxoplasma gondii growth by inhibiting both host- and parasite-encoded kinases. PLoS Pathog. 2014;10(6):e1004180. Epub

2014/06/20. doi: 10.1371/journal.ppat.1004180. PubMed PMID: 24945800; PubMed Central PMCID: PMC4055737.

58. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. Trends in molecular medicine. 2001;7(8):345-50. PubMed PMID: 11516994.

59. Schor H, Vaday GG, Lider O. Modulation of leukocyte behavior by an inflamed extracellular matrix. Dev Immunol. 2000;7(2-4):227-38. PubMed PMID: 11097214; PubMed Central PMCID: PMCPMC2276059.

60. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(12):5510-4. Epub 1995/06/06. PubMed PMID: 7539918; PubMed Central PMCID: PMC41725.

61. Yurdakul P, Dalton J, Beattie L, Brown N, Erguven S, Maroof A, et al. Compartmentspecific remodeling of splenic micro-architecture during experimental visceral leishmaniasis. Am J Pathol. 2011;179(1):23-9. Epub 2011/06/28. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.03.009. PubMed PMID: 21703391; PubMed Central PMCID: PMC3123882.

62. Paun A, Bankoti, R., Joshi, T., Pitha, P.M., and Stäger, S. Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to Leishmania donovani infection. PLoS Pathog. 2011;in press.

63. Bonfa G, Benevides L, Souza Mdo C, Fonseca DM, Mineo TW, Rossi MA, et al. CCR5 controls immune and metabolic functions during Toxoplasma gondii infection. PLoS One. 2014;9(8):e104736. Epub 2014/08/15. doi: 10.1371/journal.pone.0104736. PubMed PMID: 25119429; PubMed Central PMCID: PMC4132074.

64. Sarkar K, Cai Z, Gupta R, Parajuli N, Fox-Talbot K, Darshan MS, et al. Hypoxiainducible factor 1 transcriptional activity in endothelial cells is required for acute phase cardioprotection induced by ischemic preconditioning. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109(26):10504-9. Epub 2012/06/16. doi: 10.1073/pnas.1208314109. PubMed PMID: 22699503; PubMed Central PMCID: PMC3387090.

## **Figure legends**

Figure 1. Myeloid cells, particularly Ly6C<sup>hi</sup> and Ly6C<sup>lo/int</sup> monocytes, accumulate in the spleen of *L. donovani* infected mice over the course of infection. Mice were infected with *L. donovani* and sacrificed at various time points after infection. Neutrophils were excluded from all analysis involving monocytes. (A) Representative FACS plots depicting the gating strategy used to identify neutrophils (left) and percentage of neutrophils in the spleen of infected mice (right).(B) Gating strategy used to identify Ly6C<sup>+</sup> monocytes (left) and percentage of splenic Ly6C<sup>hi</sup> (upper graph) and Ly6C<sup>lo/int</sup> (lower graph) monocytes. (C) Percentage of CD11c<sup>+</sup> myeloid cells. (D) Percentage of CD11c<sup>+</sup> Ly6C<sup>+</sup> (left histogram raw and upper graph) and Ly6C<sup>lo/int</sup> (right histogram raw and lower graph) monocytes. All data represent mean  $\pm$  SEM of one of 4 independent experiments, n = 4.

Figure 2. HIF-1*a*- deficient mice in CD11c<sup>+</sup> cells show increased frequency and numbers of inflammatory monocytes in the spleen.  $Hif^{flox/flox}-Cd11c-Cre^+$  and  $Cre^-$  mice were infected with *L. donovani* and sacrificed at various time point of infection. Neutrophils were excluded from all analysis involving monocytes. (A) Representative FACS plots depicting L6C<sup>+</sup> monocytes in *Cre<sup>-</sup>* (upper graphs) and *Cre<sup>+</sup>* (lower graphs) mice over the course of infection. (B-F) Percentage (upper graph) and absolute numbers (lower graph) of splenic Ly6C<sup>hi</sup> monocytes (B), Ly6C<sup>lo/int</sup> monocytes (C), Ly6G<sup>+</sup>neutrophils (D), F4/80<sup>+</sup>cells (E), CCR2<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> monocytes (F). (G) Percentage of splenic MHCII<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> monocytes. (H) Percentage of splenic Sca-1<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> monocytes. (I) Percentage of splenic Ly6C<sup>+</sup> Ly6G<sup>+</sup> neutrophils. All data represent mean ± SEM of one of 4 independent experiments, n = 4. \* denotes *p*<0.05.

Figure 3. HIF-1 $\alpha$  induces an M2-like phenotype and limits leishmanicidal capacity in myeloid cells. *Hif<sup>flox/flox</sup>-Cd11c-Cre*<sup>+</sup> and *Cre*<sup>-</sup> mice were infected with *L. donovani* and sacrificed at various time point of infection. (A—F) Real-time PCR analysis of mRNA expression levels in splenic CD11b<sup>+</sup> cells purified from infected mice at various time points after infection for (A) *Tnf*, (B) *Arg1*, (C) *Fizz1*, (D) *Mgl1*, (E) *Mgl2*, and (F) *iNOS*. (G) Immonohistochemical analysis of splenic sections from naïve and infected mice at d14 and 28 p.i.; CD169 (red), B220 (green), CD11b (blue); magnification: 10x.

Figure 4. *L. donovani* amastigotes strongly induce iNOS production in HIF-1*a*-deficient BMM. Macrophages were derived for six days from the bone marrow of naïve  $Hif^{flox/flox}$ -*Cd11c*-*Cre*<sup>+</sup> and *Cre*<sup>-</sup> mice. Cells were then activated with IFN $\gamma$  or IL-4, or infected *L. donovani*. Polarization and infection were monitored for 24h. (A) Representative FACS plot for macrophages expressing CD38<sup>+</sup> (left panels) and *iNOS*<sup>+</sup> (right panels) in *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-cre*<sup>-</sup> (WT) and *Cre*<sup>+</sup> (KO) mice. Frequency of (B) CD38<sup>+</sup> and (C) iNOS<sup>+</sup> in different polarization conditions and following infection. (D—I) Real-time PCR analysis of mRNA expression levels in in vitro polarized and infected BMM. (D) *Arg1*, (E) *Fizz1*, (F) *II10*, (G) *Hif1a*, (H) *Pgk1* and (I) *Glut1*. All data represent mean ± SEM, n = 3. \* denotes *p*<0.05, \*\* denotes *p*<0.01, and \*\*\* denotes p<0.001. **Figure 5. HIF-1***a* governs glucose metabolism in *L. donovani* infected splenocytes. *Hif*<sup>*flox/flox*-*Cd11c-Cre*<sup>+</sup> and *Cre*<sup>-</sup> mice were infected with *L. donovani* and sacrificed at various time point of infection. (**A**) Intracellular lactate concentration and (**B**) intracellular glucose concentration in splenocytes from infected mice at various time points of infection. (**C**) Mean fluorescence intensity of ROS expression in splenocytes from infected mice over the course of infection. (**D**) Percentage of ROS<sup>+</sup> neutrophils. (**E**) Percentage of ROS<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> monocytes. (**F**) Frequency of CD11b<sup>hi</sup>Ly6C<sup>+</sup> splenocytes expressing IFNγR. All data represent mean  $\pm$  SEM of one of 4 independent experiments, n = 4. \* denotes *p*<0.05, \*\* denotes *p*<0.01, and \*\*\* denotes *p*<0.001</sup>

#### Figure 6. HIF-1α enhances the inhibitory functions of myeloid cells during chronic VL.

Naïve CD4 T cells were stimulated with plate bound  $\alpha$ CD3 and  $\alpha$ CD28 in the presence of rIL-12. (**A**) Representative FACS plots showing IFN $\gamma$  production by CD4 T cells co-incubated or not with CD11b<sup>+</sup> cells purified from the spleen of *L. donovani* infected mice. (**B**) Percentage of inhibition of IFN $\gamma$  production calculated as described in the material and methods section. All data represent mean ± SEM of one of 3 independent experiments, n = 3. \* denotes *p*<0.05 and \*\* denotes *p*<0.01.

Figure 7. HIF-1 $\alpha$  deficient intermediate stage monocytes are more resistant to *L. donovani* infection under hypoxic conditions. Monocytes were derived for three days from the bone marrow of naïve *Hif*<sup>flox/flox</sup>-*Cd11c*-*Cre*<sup>+</sup> and *Cre*<sup>-</sup> as described in the material and method section. M-CSF was then removed from the medium and cells were then infected with fluorescently-labelled *L. donovani* amastigotes prior to activation or not with IFN $\gamma$ . The infection was

monitored for 24h. (**A-B**) Percentage of infected Ly6C<sup>hi</sup> (**A**) and Ly6C<sup>lo/int</sup> (**B**) monocytes. (**C**) Examples of ImageStream analysis; pictures illustrate: nucleus (purple), parasites (green), Ly6C (red). (**D-E**) ImageStream analysis of numbers of parasites per cells in Ly6C<sup>hi</sup> (**D**) and Ly6C<sup>lo/int</sup> (**E**) monocytes at 1h (left graph), 12h (middle graph) and 24h (right graph). (**F-G**) Monocytes were treated as described above, but M-CSF was left in the medium. (**F**) Percentage of Ly6C<sup>hi</sup> and (**G**) Ly6C<sup>lo/int</sup> monocytes infected with *L. donovani*. All data represent mean  $\pm$  SEM of one of 2 independent experiments, n = 3. \* denotes *p*<0.05, \*\* denotes *p*<0.01

Figure 8. CD11c-specific HIF-1a-knockout mice produce more monocyte's progenitors and display enhanced output of inflammatory monocytes in the bone marrow.  $Hif^{flox/flox}-Cd11c$ - $Cre^+$  and  $Cre^-$  mice were infected with *L. donovani* and sacrificed at various time point of infection. (A) Gating strategy to identify GMPs in the bone marrow of *L.donovani* infected mice. (B) Frequency (left graph) and absolute numbers (right graph) of GMPs in the bone marrow of mice over the course of infection. (C-E) Frequency (upper graph) and absolute numbers (lower graph) of granulocytes (C), Ly6C<sup>hi</sup> monocytes(D), Ly6C<sup>lo/int</sup> monocytes (E) in the bone marrow of infected mice. (F-G) Percentage of CCR2<sup>+</sup> (F) and CXCR4<sup>+</sup> (G) Ly6C<sup>hi</sup> monocytes in the bone marrow. (I) Percentage of MHCII<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> monocytes in the bone marrow. All data represent mean  $\pm$  SEM of one of 4 independent experiments, n = 4. \* denotes *p*<0.05.

Figure 9. HIF-1a expression in CD11c<sup>+</sup> cells exacerbates infection in the bone marrow.  $Hif^{flox/flox}-Cd11c-Cre^+$  and  $Cre^-$  mice were infected with *L. donovani* and sacrificed at various time point of infection. Graph shows the number of parasites present in one tibia and one femur of each infected mouse over the course of infection. All data represent mean ± SEM of one of 4 independent experiments, n = 4. \* denotes *p*<0.05 and \*\* denotes *p*<0.01.

## **Supplemental Figure legends**

## Figure S1

 $Hif^{flox/flox}$ -Cd11c-Cre<sup>+</sup> and Cre<sup>-</sup> mice were infected with L. donovani amastigotes and sacrificed at various time points of infection. (A) Graph represents the splenic parasite burden expressed as Leishman Donovan Units (LDU). (B) DNGR1 expression by conventional CD11c<sup>hi</sup> splenic CD4<sup>+</sup> (upper panel) and CD8<sup>+</sup> (lower panel) DCs at d14 p.i.. All data represent mean ± SEM of one of 4 independent experiments, n = 4.

## **Figure S2**

Mice were infected with  $2x10^7$  LV9 amastigotes intravenously. (A) Graph represents real-time PCR analysis of HIF-1 $\alpha$  mRNA and (B) HIF-1 $\alpha$  protein expression in splenic CD11c<sup>+</sup> cells purified from *Hif*<sup>flox/flox</sup>-*Cd11c*-*Cre*<sup>+</sup> and *Cre*<sup>-</sup> mice at various time points after infection.

## Figure S3

Mice were infected with  $2x10^7$  LV9 amastigotes intravenously. Representative FACS plot for Ly6G<sup>hi</sup> neutrophils (**A**) and F4/80<sup>+</sup> cells (**B**) in *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre*<sup>-</sup> (left panels) and *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre*<sup>+</sup> mice (right panels).

## Figure S4

Mice were infected with  $2x10^7$  LV9 amastigotes intravenously. Representative FACS plot for CCR2<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> Ly6C<sup>hi</sup> (**A**) and Ly6C<sup>low/int</sup> (**B**) monocytes in *Hif-1a<sup>flox/flox</sup>Cd11c-Cre<sup>-</sup>* (left panels) and *Hif-1a<sup>flox/flox</sup>Cd11c-Cre<sup>+</sup>* mice (right panels). (**C**) Representative FACS plot for Ly6C<sup>hi</sup> monocyte expressing MHCII<sup>+</sup> in *Hif-1a<sup>flox/flox</sup>Cd11c-cre<sup>-</sup>* (left panels) and *Hif-1a<sup>flox/flox</sup>Cd11c-Cre<sup>+</sup>* mice (right panels). (**D**) Representative FACS plot for surface expression of Ly6C on CD11b<sup>hi</sup> Ly6G<sup>hi</sup> neutrophils in *Hif-1a<sup>flox/flox</sup>Cd11c-Cre<sup>-</sup>* (left panels) and *Hif-1a<sup>flox/flox</sup>Cd11c-Cre<sup>-</sup>* (left panels).

### Figure S5

Mice were infected with  $2x10^7$  LV9 amastigotes intravenously. (A) Representative histograms for total ROS production at various time points of infection in *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre*<sup>-</sup> and Cre<sup>+</sup> mice. (**B-C**) Representative FACS plots for ROS expression in Ly6G<sup>hi</sup> neutrophils (**B**) and Ly6C<sup>hi</sup> monocytes (**C**) from *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre*<sup>-</sup> (left panels) and *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre*<sup>+</sup> mice (right panels).

## Figure S6

(A) Splenocytes from naïve and *L. donovani* infected mice (d28 p.i.) were stained with hypoxyprobe and analyzed by FACS. (B) Western Blot analysis of HIF-1 $\alpha$  expression in infected bone marrow-derived monocytes. Monocytes were derived under hypoxia for three days from the bone marrow of naïve *Hif*<sup>flox/flox</sup>-*Cd11c*-*Cre*<sup>+</sup> and *Cre*<sup>-</sup>. M-CSF was then removed from the

medium and cells were infected with fluorescently-labelled *L. donovani* amastigotes prior to activation or not with IFN $\gamma$ . (The infection was monitored for 1h, 12h and 24h. (A) Representative FACS plots for LV9<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> (**C**) and LV9<sup>+</sup>Ly6C<sup>low/int</sup> moncoytes (**D**).

## Figure S7

Monocytes were derived under hypoxia for three days from the bone marrow of naïve  $Hif^{lox/flox}$ -*Cd11c-Cre*<sup>+</sup> and *Cre*<sup>-</sup>. Cells were then infected with fluorescently-labelled *L. donovani* amastigotes prior to activation or not with IFN $\gamma$ ; M-CSF was kept in the medium. The infection was monitored for 12 and 24h. Representative FACS plots for LV9<sup>+</sup>Ly6C<sup>hi</sup> (**A**) and LV9<sup>+</sup> Ly6C<sup>low/int</sup> moncoytes (**B**).

## Figure S8

Real-time PCR analysis of mRNA expression levels  $Hif2\alpha$  in splenic CD11c<sup>+</sup> cells purified from infected  $Hif^{flox/flox}$ -Cd11c-Cre<sup>+</sup> and Cre<sup>-</sup> mice at various time points after infection.

# Figures

B)

CD11b

d14

2.63

**d28** 1.99

Ly6C

Figure 1 A) d14 d21



d21

1.76

d35

1.61

1.09

1.66



4

% Sp Ly6C<sup>hi</sup> cells

0

4 -

3 -

2

0

% Sp Ly6C<sup>lo/int</sup> cells

51 52 52° 55°

81 × 82 82 835

0.66

3.28



Figure 2



C)

2.0

1.5

1.0

0.5

0.0

25

20-15-

10-

5.

0 -

100

80

60

40

20

0

80

60

40

20

0

374

81A 82

81A 82 828

828 18

83<sup>55</sup>

374 82 828

% Sp Ly6C<sup>lo/int</sup> (cells

# Sp Ly6C<sup>lo/int</sup> cells (10<sup>6</sup>)

% Sp Ly6C<sup>lo/int</sup> CCR2<sup>+</sup> F4/80<sup>+</sup> cells







సో



B)

% Sp Ly6C<sup>hi</sup> cells

# Sp Ly6C<sup>hi</sup> cells (10<sup>6</sup>)

E)

% Sp F4/80<sup>+</sup>

2.5 2.0 1.5

1.0

0.5 0.0

40·

30

20 10 0

2.5

2.0

1.5 cells

1.0

0.5 0.0

40 -

30

20·

314 82 820 సో

onto

81A 82

82 828

> 828 సో

సో

















F)







Figure 5.



















G)

80 -

60



\*\*

828

89

82

5NA

8

H)

20 -

15 -10 -

5

0

% Sca-1\*Ly6C<sup>hi</sup> cells



I)

% MHCII \*Ly6Chi cells

25 -20 -15 -

10 -5 · 0 ·

8

828 82^ 87A

85





51A 82 828 835

## Figure 9.


### **Supplemental Figures**



A)



B)













Figure S4













#### Figure S5



168

#### Figure S6

A)







...





B)



#### Table 1:

Primer sequences used in qPCR

Primers	Sequence
Hprt	FP, 5'-GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG-3' RP, 5'-GATTCAACCTTGCGCTCATCTTAGGC-3'
Hif-1α	FP, 5'-TCACCTGCTGCTATACATTCAC-3' RP, 5'-TCACCTGCTGCTATACATTCAC-3'
Tnf	FP, 5'-AGGGATGAGAAGTTCCCAAATG-3' RP, 5'-GGCTTGTCACTCGAATTTTGAGA-3'
Inos	FP, 5'-CGAAACGCTTCACTTCCAA-3' RP, 5'-TGAGCCTATATTGCTGTGGCT-3'
Arg-1	FP, 5'-CCACAGTCTGGCAGTTGGAAG-3' RP, 5'-GGTTGTCAGGGGAGTGTTGATG-3'
Fizz-1	FP, 5'-CCTGCTGGGATGACTGCTA-3' RP, 5'-TGGGTTCTCCACCTCTTCAT-3'
Mgl-1	FP, 5'-CAGAATCGCTT AGCCAATGTGG-3' RP, 5'-TCCCAGTCCGTGTCCGAAC-3'
Mgl-2	FP, 5'-TTCAAGAATTGGAGGCCACT-3' RP, 5'-CAGACATCGTCATTCCAACG-3'
Hif-2a	FP, 5'-GGGAACACTACACCCAGTGC-3' RP, 5'-TCTTCAAGGGATTCTCCAAGG-3'
Pgk-1	FP, 5'-CTGTGGTACTGAGAGCAGCAAGA-3' RP, 5'-CAGGACCATTCCAAACAATCT G-3'
Glut-1	FP, 5'-CGTGCTTATGGGTTTCTCCAAA-3' RP, 5'-GACACCTCCCCCACATACATG-3'
IL-10	FP, 5'-AGGGTTACTTGGGTTGCCAA-3' RP, 5'-CACAGGGGAGAAATCGATGA-3'

Chapitre 3

## HIF-1α hampers dendritic cell function and Th1 generation during chronic visceral leishmaniasis

#### Résumé

Bien que l'inflammation soit nécessaire pour le contrôle d'une infection, elle s'avère responsable de la pathogenèse dans certaines maladies chroniques. *Leishmania donovani*, l'agent causatif de la leishmaniose viscérale, induit une forte réponse inflammatoire menant à une splénomégalie ainsi qu'une immunosuppression. Les tissus inflammés sont caractérisés par un faible taux d'oxygène ce constituant ainsi un environnement favorable pour l'induction et la stabilisation du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$ . Dans un travail antérieur, nous avons montré le rôle critique de ce facteur dans la fonction des DCs durant la phase aigüe de l'infection. Dans cette étude, nous explorons son rôle durant la phase chronique ainsi que effet sur la génération de la réponse des cellules CD4 Th1. Nos résultats mettent évidence l'effet inhibiteur du HIF-1 $\alpha$  dans les DCs maintien une augmentation de la production de l'IL-12 nécessaire pour l'amorçage et l'amélioration des cellules T CD4 productrice de l'IFN<sub>Y</sub> aussi bien dans la rate que dans la moelle osseuse. Dans l'ensemble la déplétion de HIF-1 $\alpha$  dans les DCs entraine un efficace contrôle de la charge parasitaire dans les deux organes. En conclusion l'expression du HIF-1 $\alpha$  dans les DCs contribue à l'établissement d'une infection persistent par le parasite.

# HIF-1α hampers dendritic cell function and Th1 generation during chronic visceral leishmaniasis

#### Akil Hammami, Belma Melda Abidin, Krista M. Heinonen, and Simona Stäger\*

INRS-Institut Armand-Frappier and Center for Host-Parasite interactions, 531 Boulevard des Prairies, Laval (QC), H7V 1B7, Canada

\*Address correspondence to: Simona Stäger

INRS – Institut Armand-Frappier 531, Boulevard des Prairies Laval, QC H7V 1B7 Canada Phone: +1- 450-687-5010, ext. 4403 Fax: +1- 450-686-5501 simona.stager@iaf.inrs.ca

#### Abstract

Inflammation, although responsible for controlling infection, is often associated with the pathogenesis of chronic diseases. *Leishmania donovani*, the causative agent of visceral leishmaniasis, induces a strong inflammatory response that leads to splenomegaly and ultimately immune suppression. Inflamed tissues are typically characterized by low levels of oxygen, a microenvironment that triggers the hypoxia-inducible transcription factor  $1\alpha$  (HIF- $1\alpha$ ). Although HIF- $1\alpha$  plays an integral role in dendritic cell function, its involvement in the generation of protective Th1 responses against *Leishmania* has not yet been studied.

Here we demonstrate that HIF-1 $\alpha$  inhibits IL-12 production in dendritic cells, limiting therefore Th1 cell development. Indeed, depletion of HIF-1 $\alpha$  in CD11c<sup>+</sup> cells resulted in higher and sustained expression of IL-12 and complete abrogation of IL-10. Moreover, CD11c-specific HIF-1 $\alpha$ -deficient mice showed higher frequencies of IFN- $\gamma$ -producing CD4 T cells in the spleen and bone marrow and, consequently, a significantly reduced parasite burden in both organs. Taken together, our results suggest that HIF-1 $\alpha$  expression in dendritic cells largely contributes to the establishment of persistent *Leishmania* infection and may therefore represent a possible therapeutic target.

Key words: HIF-1α, dendritic cells, Th1, *Leishmania* 

#### Introduction

A balance between inflammatory and anti-inflammatory responses is essential for the proper functioning of the immune system. An imbalance towards strong inflammation can lead to several autoimmune diseases, like arthritis; in contrast, when anti-inflammatory responses dominate, the result is immunosuppression. Pathogens are a remarkable challenge for the immune system. Indeed, they have developed several strategies to evade specific immune responses and establish a microenvironment prosperous for their growth. For instance, LCMV triggers a potent inflammatory response that leads to generalized immune suppression, while the protozoan parasite *Toxoplasma gondii* drives an anti-inflammatory response mainly by inducing IL-10 and TGF $\beta$  production<sup>1</sup>.

Sustained inflammation is fundamental for efficient T cell priming and pathogen clearance. The pro-inflammatory cytokine IL-12, for example, is crucial for CD8 T cell and Th1 cell priming and effector function acquisition <sup>2</sup>. The transcription factor IRF-5, in particular, seems to be crucial for Th1 generation<sup>3,4</sup>. The inflammatory milieu was also shown to control antigen sensitivity by enhancing T cell receptor signaling. Likewise, type I IFN and IFN $\gamma$  also appear to be required for efficient CD8 T cells priming<sup>5</sup>. Despite the clear role of inflammation in positively shaping T cell responses, some exceptions were reported. Indeed, a chronic inflammatory environment negatively impacts the development of memory CD8 T cell responses<sup>6</sup>. Inflammation also seems to play a negative role in CD8 T cell priming in an experimental model of visceral leishmaniaisis (VL).

Visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form of leshmaniasis. The protozoan parasite *Leishmania donovani* is one of the causative agents of the disease. In the murine model, as well as in human patients, the parasite establishes persistent infection in the spleen and bone marrow.

*L. donovani* is known to induce a strong inflammatory response, characterized by the production of high amounts of IL-6 and TNF  $^{7}$ . This results in splenomegaly, TNF-mediated the splenic tissue disruption, and ultimately in immunosuppression, mainly mediated by IL-10  $^{7}$ .

Chronically infected and inflamed tissues are typically hypoxic. Low oxygen tensions and tissue disruption create an environment that triggers the stabilization of the hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ). HIF-1 $\alpha$  stabilization can also be directly induced by various pathogens, including *Leishmania* parasites <sup>8</sup>. The upregulation and stabilization of HIF-1 $\alpha$  has been reported to alter dendritic cell (DCs) functions and migratory capacity (<sup>9</sup>; reviewed in <sup>10,11</sup>). HIF-1 $\alpha$  appears to down modulate costimulatory molecule expression and impair upregulation of the chemokine receptor CCR7, which is necessary for the homing to secondary lymphoid organs <sup>12</sup>. Interestingly, HIF-1 $\alpha$  stabilization in DCs also induces TNF and IL-1 $\beta$  expression.

In this study, we seek to investigate the role of HIF-1 $\alpha$  in splenic DCs and to understand how this interferes with the priming and maintenance of protective Th1 responses during chronic VL. Our data demonstrate that HIF-1 $\alpha$  hampers IL-12 expression and induces IL-10 in DCs. Moreover, CD11c-specific ablation of HIF-1 $\alpha$  results in stronger IFN $\gamma^+$  CD4 T responses and an increased control of parasite growth in the spleen and the bone marrow.

#### Results

### Cell-specific ablation of HIF-1α in CD11c<sup>+</sup> cells increases the recruitment of CD4 T cells to the spleen and enhances Th1 responses

We have previously demonstrated that HIF-1 $\alpha$  is up-regulated and stabilized in splenic CD11c<sup>hi</sup> DC during acute *Leishmania donovani* infection <sup>13</sup>. Moreover, CD11c-specific HIF-1 $\alpha$  deficient mice were highly resistant to infection. Control of parasite growth during the first 14 days of infection in the spleen was dependent on antigen-specific CD8 T cell responses <sup>13</sup>. Because, *L. donovani* infection leads to splenomegaly and chronic inflammation, we next wanted to know if HIF-1 $\alpha$  was involved at all in the immune response to the parasite during persistent infection. Interestingly, *Hif<sup>floxflox</sup> – Cd11c cre*<sup>+</sup> mice showed a significantly lower splenic (<sup>13</sup>, and Figure 1A) and bone marrow (Figure 1B) parasite burden compared to their *Cre*<sup>-</sup> littermates, suggesting that HIF-1 $\alpha$  in DCs may play an important role during chronic VL as well. No differences between both groups were observed in the liver parasite load (Figure 1C). In contrast to the acute phase, control of parasite growth was not associated to improved CD8 T cell responses. Indeed, no differences were observed in the recruitment to the spleen (Figure 1D and E) or in the production of IFN $\gamma$  (Figure 1F) by adoptively transferred CD45.1-OT-I CD8 T cells in Hifflox<sup>*flox*</sup> – *Cd11c Cre*<sup>+</sup> mice infected with ovalbumin-transgenic *L. donovani*.

Hence, we investigated whether CD4 T cells were involved in increased parasite clearance in CD11c-specific HIF-1 $\alpha$ -deficient mice. CD4 T cells are known to play a protective role during VL by producing IFN $\gamma$ , a cytokine capable of inducing leishmanicidal capacities in macrophages

We first assessed the frequency and numbers of CD4 T cells present in the spleen between d14 and 35 p.i.. As shown in Figure 2A and B, CD4 T cells were present at significantly higher frequencies (Figure 2A) and numbers (Figure 2B) at d28 and 35 p.i. in the spleen of  $Cre^+$  mice compared to  $Cre^-$  controls. When we examined splenic IFN $\gamma^+$  CD4 T cells, we found that  $Hif^{flox/flox} - Cd11c Cre^+$  showed a significantly higher frequency of IFN- $\gamma$ -producing CD4 T cells at d28 and 35 p.i. compared to their  $Cre^-$  littermates (Figure 2C and D). Moreover, CD4 T cells from HIF-1 $\alpha$  conditional knock-outs appeared to produce higher amounts of IFN $\gamma$  compared to HIF-1 $\alpha$ -sufficient mice (Figure 2C and E). These results suggest that the depletion of HIF-1 $\alpha$  in CD11c<sup>+</sup> cells results in more efficient expansion of functional splenic Th1 cells.

Because disease exacerbation has been associated to IL-10 produced by CD4 T cells <sup>15,16</sup>, we next monitored the frequencies and numbers of IL-10-producing CD4 T cells in the spleen. No differences were observed in frequencies and numbers of splenic IFN $\gamma^+$ IL-10<sup>+</sup> double producing CD4 T cells in *Cre*<sup>+</sup> and *Cre*<sup>-</sup> mice over the course of infection (Figure 2Fand G). Similar results were obtained when we assessed IL-10 single producers, with exception of d28p.i., when a slight increase in the numbers, but not the frequency, of these cells was observed in *Cre*<sup>+</sup> mice (Figure 2H and I).

## 2. HIF-1α deficiency in CD11c<sup>+</sup> cells results in stronger Th1 responses in the bone marrow

Because *L. donovani* establishes chronic infection in the bone marrow (BM) and  $Hif^{lox/flox}$  – *Cd11c Cre*<sup>+</sup> bared fewer parasites at this site (Figure 1B) we next monitored the recruitment of CD4 T cells to the BM. Interestingly, the percentage and the number of CD4 T cells constantly increased over the course of infection to reach a peak at d35 p.i. in both groups of mice (Figure 3A and B). IFN $\gamma^+$  CD4 T cells were also increasingly present in the BM over the course of infection; however, the frequency (Figure 3C and D) and numbers (Figure 3C and E) of these cells dropped at d35p.i., as observed in the spleen. Interestingly, higher percentages of IFN $\gamma^+$  CD4 T cells were observed in the BM of mice deficient for HIF-1 $\alpha$  in CD11c<sup>+</sup> cells at d21 and 28p.i. (Figure 3C and D). In these animals, CD4 T cells also expressed higher amounts of IFN $\gamma$  at d28 p.i. compared to littermate controls (Figure 3C and 3E).

We also monitored IL-10-producing CD4 T cells in the bone marrow of infected mice. Frequencies and numbers of IFN $\gamma^+$ IL-10<sup>+</sup> (Figure 3F and G) and IL-10<sup>+</sup> (Figure 3H and I) were similar in both group of mice over the course of *L. donovani* infection.

Taken together, these results suggest that HIF-1 $\alpha$  expression in CD11c<sup>+</sup> cells may inhibit CD4 T cells recruitment to bone marrow and/or inhibit the development of Th1 responses during chronic VL.

#### 3. Dendritic cell migration to the spleen is not affected by the absence of HIF-1 $\alpha$

IL-12-producing DCs are responsible for priming IFNγ-secreting CD4 T cells during experimental VL <sup>17</sup>. Because stronger Th1 responses were observed in the absence of HIF-1α in CD11c<sup>+</sup> cells and HIF-1α is known to regulate CCR7 expression and myeloid cell migration <sup>9,18,19</sup>, we compared the phenotype and frequency of conventional CD11c<sup>hi</sup> splenic DCs of  $Hif1a^{flox/flox} - Cd11c$ - $Cre^+$  and  $Cre^-$  mice during *L. donovani* infection. Conventional splenic DCs were defined as CD11c<sup>hi</sup>MHCII<sup>hi</sup> cells (Figure 4A). No major differences were observed in the frequency (Figure 4B) and numbers (Figure 4C) of total splenic CD11c<sup>hi</sup> DCs between both experimental groups. Interestingly, when we analysed the expression of CD4 and CD8 in CD11c<sup>hi</sup> DCs (Figure 4D), we noticed that the percentage of CD11b<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> DCs was slightly reduced in  $Cre^+$  mice (Figure 4E), while the frequency of CD8<sup>+</sup> DCs was lower in  $Cre^-$  control mice (Figure 4F).

We next determined the origin of splenic CD11 $c^{hi}$  DC by monitoring their DNGR-1 surface expression over the course of infection. As expected, about 85-90% of the CD8<sup>+</sup> CD11 $c^{hi}$  DC population expressed DNGR-1, suggesting that these cells were bone marrow descendants <sup>20</sup> (Figure 4G and H). In contrast, the percentage of DNGR-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> DCs varied during the course of infection. About 30% of CD4 T cells were DNGR-1<sup>+</sup> in naïve mice of both groups; this percentage decreased during the first 3 weeks of infection to increase again at d28 p.i. (Figure 4I and J), suggesting that the majority of CD4<sup>+</sup> DCs derived from monocytes during acute VL. No differences were observed between  $Cre^+$  and  $Cre^-$  mice. Taken together, our results show that the absence of HIF-1 $\alpha$  expression in DCs did not majorly affect their migration from the bone marrow or the differentiation from monocytes. Hence, the stronger Th1 responses observed in  $Cre^+$  compared to  $Cre^-$  mice may be a consequence of improved DC functions.

#### 4. HIF-1α expression alters DC functions

We next assessed if HIF-1 $\alpha$  was expressed in splenic DCs from d14 to d35 p.i. and whether HIF-1 $\alpha$  expression would alter DC functions. As shown in Fig. 5A, splenic CD11c<sup>+</sup> cells had already upregulated HIF-1 $\alpha$  at d14 p.i.; this upregulation was sustained during chronic VL. Next, we evaluated the expression of IL-12p35 and IL-12p40 by CD11c<sup>+</sup> cells isolated from the spleen of *L. donovani* infected mice at various time points p.i. As shown in Figure 5B, IL-12p35 expression was sustained over the course of infection in *Hif1a<sup>flox/flox</sup>* - *Cd11c-Cre*<sup>+</sup> mice compared to the *Cre*<sup>-</sup> control group. Similar results were obtained when we measured IL-12p40 (Figure 5C), suggesting that HIF-1 $\alpha$  induction in splenic DCs hampered IL-12 expression.

We also measured the expression of IL-10, a cytokine known to be associated with disease exacerbation (Murphy ML et al., 2001). No IL-10 mRNA accumulation was detected in infected HIF-1 $\alpha$  deficient CD11c<sup>+</sup> cells (Figure 5D); in contrast, HIF-1 $\alpha$ -sufficient CD11c<sup>+</sup> cells continuously expressed this cytokine (Figure 5D). Interestingly, splenic CD11c<sup>+</sup> cells lacking HIF-1 $\alpha$  also failed to upregulate TNF mRNA levels compared to their HIF-1 $\alpha$ -sufficient controls (Figure 5E). Baseline mRNA levels for HIF-1 $\alpha$  and all cytokine in naïve DCs of both groups of mice can be found in Supplemental Figure 1A-E.

Taking together, our results suggest that the induction of HIF-1 $\alpha$  in splenic DCs during chronic VL inhibits IL-12 while inducing IL-10 expression. The impairment in the balance between the two cytokines may lead to inefficient priming of protective Th1 responses.

#### Discussion

The transcription factor HIF-1 $\alpha$  is known to regulate the function and the migratory capacity of myeloid cells <sup>9,10,21</sup>. However, its effect varies from model to model. The current study demonstrates that HIF-1 $\alpha$  stabilization in splenic DCs results in the downregulation of IL-12 with concomitant upregulation of IL-10 expression. CD11c-specific ablation of HIF-1 $\alpha$  led to stronger IFN $\gamma^+$  CD4 T responses and increased control of parasite growth in the spleen and the bone marrow.

The microenvironment, especially in chronically inflamed tissues, is involved in shaping the immune response. Although inflammation is crucial for inducing and sustaining effector T cell responses <sup>6</sup>, it can also have adverse effects. Chronically infected organs are highly hypoxic, a condition that promotes the stabilization of HIF-1 $\alpha$ . Visceral leismaniasis represents an ideal model to study the effect of chronic inflammation on the immune response to a pathogen. Indeed, *L. donovani* establishes persistent infection in the spleen and bone marrow. This is paralleled by a dramatic enlargement of the spleen, which is more prominent after d21 p.i.. Following infection, high levels of IL-6 and TNF are induced by the parasite <sup>13 22</sup>. Although TNF is essential to clear infection in the liver, it was also reported to be responsible for the disruption of the splenic microarchitecture, which has severe consequences, among other, on T cell migration <sup>23,24</sup>. Tissue disruption together with chronic inflammation typically leads to HIF-1 $\alpha$  stabilization <sup>10</sup>. This physiologic response is designed to allow cells to survive under harsh conditions. However, it can also result in immunosuppression <sup>10</sup>.

We have previously reported that HIF-1 $\alpha$  expression in DCs resulted in reduced expansion of CD8 T cell responses. CD8 T cells are cross-primed by CD8<sup>+</sup> DCs, which are mostly bone marrow derived (<sup>20</sup> and Figure 4F and G). In this study, we extended our analysis to DCs during the chronic phase of VL, which are mainly monocyte derived (Figure 4G). HIF-1 $\alpha$  depletion in DCs significantly decreased the parasite load in the spleen and bone marrow. This effect could not be attributed to stronger CD8 T cell responses, since CD8 T cells are functionally exhausted during chronic *L. donovani* infection <sup>25</sup> and no functional differences were observed in both groups of mice. Interestingly, the absence of HIF-1 $\alpha$  in DCs directly affected Th1 responses. CD4 T cell responses are first detectable at low levels at d14 p.i.; the peak of response is reached at d28 p.i. <sup>24,26</sup>. In HIF-1 $\alpha$ -deficient mice, we not only observed a higher frequency of protective IFN $\gamma^+$  CD4 T cells, but these cells were also producing higher amounts of IFN $\gamma$  in both target organs, the spleen and the bone marrow. This suggests that Th1 responses were either primed and/or maintained more efficiently in *Cre*<sup>+</sup> mice.

Interestingly, no major differences were observed in the frequency and numbers of CD11c<sup>hi</sup> DCs in the spleen of  $Cre^+$  and  $Cre^-$  mice, despite the fact that severe migratory defects have been described for HIF-1 $\alpha$ -deficient myeloid cells <sup>9</sup>. Moreover, HIF-1 $\alpha$  is known to regulate the expression of CCR7 <sup>18,19</sup>, a chemokine that is required for DC migration to the spleen. During experimental VL, DC migration is regulated by the CCR7 ligands CCL19/21, produced by stromal and endothelial cells <sup>27</sup>. However, defective DC migration is observed during chronic infection, due to stromal cell death and IL-10-mediated inhibition of CCR7 expression <sup>12,27</sup>. Thus it is possible that a probable migratory deficit went unnoticed because of the reduced migratory capacity of DCs in infected wild type mice. Nevertheless, HIF-1 $\alpha$ -deficient DCs expressed

significantly higher levels of IL-12p35 and p40 and lower levels of IL-10 mRNA compared to HIF-1a-sufficient cells. We do not know whether IL-10 expression was directly or indirectly regulated by HIF-1 $\alpha$  or is a consequence of a lower parasite burden. Because IL-10 production by T cells was unaltered between infected  $Cre^+$  and  $Cre^-$  mice, perhaps the second hypothesis is the correct one. DC-derived IL-12 is crucial for inducing Th1 responses not only in Leishmania infection <sup>28</sup>, but also in other infectious disease models <sup>29-31</sup>. During experimental VL, IL-12 is swiftly induced within 5h of infection; however, DCs downregulate IL-12 after 24h and this cytokine expression remains low during the whole course of infection  $^{28}$ . HIF-1 $\alpha$ -deficient DCs not only expressed higher amounts of IL-12, but IL-12 expression was sustained during chronic infection. The exact mechanism by which HIF-1 $\alpha$  interferes with DC priming functions is yet unknown. Lawless et al. have recently reported that HIF-1a together with mTORC1 and iNOS coordinate DC metabolism and function in pathological microenvironments, limiting DCstimulated T cell responses. They suggest that glucose is an important signal for the development of T cell responses<sup>32</sup>. Further studies are warranted to link glucose metabolism with IL-12 and IL-10 production by DCs.

In conclusion, our results highlight the detrimental role of HIF-1 $\alpha$  in DC functions during chronic VL. The microenvironment characterized by chronic inflammation and hypoxia stabilizes HIF-1 $\alpha$ ; this is very advantageous for *L. donovani* survival <sup>8,33</sup> and concomitantly limits the development of protective Th1 responses, resulting in the establishment of chronic infection. Hence, HIF-1 $\alpha$  represents a possible therapeutic target for the treatment of VL.

#### Methods

#### Mice and parasites

C57BL/6-Tg(OT-I)- $RAG1^{im1Mom}$  mice were purchased from The Jackson Laboratory. Conditional *Hif-1a* knock-out in CD11c<sup>+</sup> cells were generated as previously described <sup>13</sup>. All mice were housed at the INRS animal facility under specific pathogen-free conditions and used at 6–10 weeks of age. Experiments involving mice were carried out under protocols approved by the Comité Institutionel de Protection des Animaux of the INRS-Institut Armand-Frappier (1510-02, 1602-02). These protocols and all methods were performed in accordance with regulations and guidelines on good animal practice provided by the Canadian Council on animal care. *Leishmania donovani* (strain LV9) was maintained by serial passage in B6.129S7-*Rag1<sup>tm1Mom</sup>* mice, and amastigotes were isolated from the spleens of infected animals. *Hif-1a* Cd11c-Cre<sup>+</sup> mice and their littermates *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>-Cre<sup>-</sup> were infected by injecting 2×10<sup>7</sup> amastigotes intravenously via the lateral tail vein. Splenic parasite burdens were determined by examining methanol-fixed, Giemsa stained tissue impression smears <sup>13</sup>. Bone marrow parasite burden were calculated by limiting dilutions <sup>13</sup>. Data are presented as number of parasites present in the bone marrow of one femur and one tibia or as Leishman Donovan Units (LDU).

#### Adoptive transfer of OT-I cells

Ovalbumin-transgenic parasites were a gift from Drs. P. Kaye and D.F. Smith (University of York, UK). Wild type and ovalbumin transgenic *Leishmania donovani* (strain LV9) were maintained by serial passage in B6.129S7-*Rag1<sup>m1Mom</sup>/J* mice, and amastigotes were isolated from the spleens of infected animals. CD45.1-OT-I/RAG1 mice, transgenic for a T cell receptor

specific for chicken ovalbumin 257–264 presented by the MHC class I molecule H-2 K<sup>b</sup>, were used as T cell donors. CD8<sup>+</sup> T cells were enriched from splenocytes of naïve CD45.1-OT-I/RAG1 animals as previously described <sup>25</sup>. 2x10<sup>4</sup> CD45.1- OT-I CD8 T cells were injected into the lateral tail vein of  $Hif1\alpha^{flox/flox} Cd11c$ - $Cre^+$  mice and their respective  $Cre^-$  littermate controls. Animals were infected the day after with ovalbumin-transgenic *Leishmania donovani* amastigotes.

The following antibodies were used to further characterize the OT-I response: FITC-conjugated anti-CD45.1 antibody and pacific blue-conjugated anti-CD8 (BD Biosciences).

#### **Flow cytometry**

Splenocytes and bone marrow cells from infected mice were analysed by flow cytometry. Cells were stained with PE-conjugated anti-DNGR-1, APC-conjugated anti-CD11c, FITC-conjugated anti-MHCII and CD4, Pacific blue-conjugated anti-CD8, and Percp-conjugated anti-CD3 (all obtained from eBioscience), as previously described <sup>13</sup>. For intracellular staining, cells were stimulated with BMDC pre-incubated with fixed parasite. 2 hours later, Brefeldin A was added and cells were incubated for further 4 hours. After fixation, cells were permeabilised and stained with APC-conjugated anti-INF $\gamma$ . Flow cytometric analysis was performed with a *BD* LSRFortessa<sup>TM</sup> cell analyser (Becton Dickinson). 5.10<sup>5</sup> cells per sample were acquired and analysed with the FACSDiva or with the flowjo software.

#### **Real-time PCR analysis**

Real-time PCR (Stratagene mx3005p Real time PCR System) was used to analyse transcripts levels of HPRT, IL-10, IL-12p35, IL-12p40, and TNF<sup>13</sup>. CD11c<sup>+</sup> cells from infected mice were purified and enriched as previously described<sup>13</sup>. Total RNA was isolated using RNeasy (Qiagen) to perform real-time RT-PCR. cDNA was prepared using 500 ng of total RNA using the High capacity cDNA Reverse Transcription kit (Bio Rad). Real time PCR was performed using standard cycle of amplification <sup>13</sup>. Gene fold increase was referred to *Hprt* reporter gene and was calculated based on values obtained in DCs from naïve mice of the respective group.

#### **Statistical analysis**

Statistical analysis was performed using a multi-way ANOVA or Student's t-test with p<0.05 considered significant. All experiments were conducted independently at least three times. \*denotes p<0.05, \*\* denotes p<0.01 and \*\*\* denotes p<0.001.

#### Data availability

All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its Supplementary Information files).

#### References

- 1 Barbosa, B. F. *et al.* IL10, TGF beta1, and IFN gamma modulate intracellular signaling pathways and cytokine production to control Toxoplasma gondii infection in BeWo trophoblast cells. *Biology of reproduction* **92**, 82, doi:10.1095/biolreprod.114.124115 (2015).
- 2 Goplen, N. P. *et al.* IL-12 Signals through the TCR To Support CD8 Innate Immune Responses. *J Immunol* **197**, 2434-2443, doi:10.4049/jimmunol.1600037 (2016).
- Paun, A., Bankoti, R., Joshi, T., Pitha, P. M. & Stager, S. Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to Leishmania donovani infection. *PLoS pathogens* 7, e1001246, doi:10.1371/journal.ppat.1001246 (2011).
- 4 Krausgruber, T. *et al.* IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nature immunology* **12**, 231-238, doi:10.1038/ni.1990 (2011).
- 5 Whitmire, J. K., Tan, J. T. & Whitton, J. L. Interferon-gamma acts directly on CD8+ T cells to increase their abundance during virus infection. *The Journal of experimental medicine* **201**, 1053-1059, doi:10.1084/jem.20041463 (2005).
- Richer, M. J., Nolz, J. C. & Harty, J. T. Pathogen-specific inflammatory milieux tune the antigen sensitivity of CD8(+) T cells by enhancing T cell receptor signaling. *Immunity* 38, 140-152, doi:10.1016/j.immuni.2012.09.017 (2013).
- 7 Bankoti, R. & Stager, S. Differential Regulation of the Immune Response in the Spleen and Liver of Mice Infected with Leishmania donovani. *J Trop Med* 2012, 639304, doi:10.1155/2012/639304 (2012).
- 8 Singh, A. K., Mukhopadhyay, C., Biswas, S., Singh, V. K. & Mukhopadhyay, C. K. Intracellular pathogen Leishmania donovani activates hypoxia inducible factor-1 by dual mechanism for survival advantage within macrophage. *PLoS One* 7, e38489, doi:10.1371/journal.pone.0038489 (2012).
- 9 Cramer, T. *et al.* HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112, 645-657 (2003).
- 10 Charpentier, T., Hammami, A. & Stager, S. Hypoxia inducible factor 1alpha: A critical factor for the immune response to pathogens and Leishmania. *Cell Immunol* **309**, 42-49, doi:10.1016/j.cellimm.2016.06.002 (2016).

- 11 Taylor, C. T. & Colgan, S. P. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. *Nat Rev Immunol* **17**, 774-785, doi:10.1038/nri.2017.103 (2017).
- Ato, M., Stager, S., Engwerda, C. R. & Kaye, P. M. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol* 3, 1185-1191, doi:10.1038/ni861 (2002).
- Hammami, A., Charpentier, T., Smans, M. & Stager, S. IRF-5-Mediated Inflammation Limits CD8+ T Cell Expansion by Inducing HIF-1alpha and Impairing Dendritic Cell Functions during Leishmania Infection. *PLoS Pathog* 11, e1004938, doi:10.1371/journal.ppat.1004938 (2015).
- 14 Kaye, P. M. & Bancroft, G. J. Leishmania donovani infection in scid mice: lack of tissue response and in vivo macrophage activation correlates with failure to trigger natural killer cell-derived gamma interferon production in vitro. *Infection and immunity* **60**, 4335-4342 (1992).
- Ranatunga, D. *et al.* A human IL10 BAC transgene reveals tissue-specific control of IL 10 expression and alters disease outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17123-17128, doi:10.1073/pnas.0904955106 (2009).
- 16 Nylen, S. & Sacks, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends in immunology* **28**, 378-384, doi:10.1016/j.it.2007.07.004 (2007).
- Stager, S. *et al.* Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against
   Leishmania donovani and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 36, 1764-1771, doi:10.1002/eji.200635937 (2006).
- 18 Wilson, J. L., Burchell, J. & Grimshaw, M. J. Endothelins induce CCR7 expression by breast tumor cells via endothelin receptor A and hypoxia-inducible factor-1. *Cancer research* 66, 11802-11807, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1222 (2006).
- 19 Li, Y., Qiu, X., Zhang, S., Zhang, Q. & Wang, E. Hypoxia induced CCR7 expression via HIF-1alpha and HIF-2alpha correlates with migration and invasion in lung cancer cells. *Cancer Biol Ther* 8, 322-330 (2009).
- 20 Schraml, B. U. *et al.* Genetic tracing via DNGR-1 expression history defines dendritic cells as a hematopoietic lineage. *Cell* **154**, 843-858, doi:10.1016/j.cell.2013.07.014 (2013).

- 21 Peyssonnaux, C. *et al.* HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *The Journal of clinical investigation* **115**, 1806-1815, doi:10.1172/JCI23865 (2005).
- 22 Arango Duque, G., Fukuda, M. & Descoteaux, A. Synaptotagmin XI regulates phagocytosis and cytokine secretion in macrophages. *J Immunol* **190**, 1737-1745, doi:10.4049/jimmunol.1202500 (2013).
- 23 Kaye, P. & Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nature reviews. Microbiology* **9**, 604-615, doi:10.1038/nrmicro2608 (2011).
- 24 Kaye, P. M. *et al.* The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* 201, 239-253, doi:10.1111/j.0105-2896.2004.00188.x (2004).
- 25 Joshi, T., Rodriguez, S., Perovic, V., Cockburn, I. A. & Stager, S. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against Leishmania donovani infections. *PLoS Pathog* 5, e1000431 (2009).
- 26 Paun, A., Bankoti, R., Joshi, T., Pitha, P.M., and Stäger, S. Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to Leishmania donovani infection. *PLoS Pathog* in press (2011).
- 27 Ato, M. *et al.* Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to Leishmania donovani infection in mice deficient in CCL19 and CCL21. *J Immunol* **176**, 5486-5493 (2006).
- 28 Gorak, P. M., Engwerda, C. R. & Kaye, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following Leishmania donovani infection. *Eur J Immunol* 28, 687-695 (1998).
- 29 Ohteki, T. *et al.* Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. *J Exp Med* **189**, 1981-1986 (1999).
- 30 Xiao, Z., Casey, K. A., Jameson, S. C., Curtsinger, J. M. & Mescher, M. F. Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN. *J Immunol* 182, 2786-2794, doi:10.4049/jimmunol.0803484 (2009).
- 31 Wilson, D. C. *et al.* Differential regulation of effector- and central-memory responses to Toxoplasma gondii Infection by IL-12 revealed by tracking of Tgd057-specific CD8+ T cells. *PLoS pathogens* 6, e1000815, doi:10.1371/journal.ppat.1000815 (2010).

- 32 Lawless, S. J. *et al.* Glucose represses dendritic cell-induced T cell responses. *Nature communications* **8**, 15620, doi:10.1038/ncomms15620 (2017).
- 33 Degrossoli, A. *et al.* The influence of low oxygen on macrophage response to Leishmania infection. *Scand J Immunol* **74**, 165-175, doi:10.1111/j.1365-3083.2011.02566.x (2011).

#### Acknowledgments

This work was supported by the Canadian Institute of Health Research grant MOP-123293 (to S.S.) and PJT-148614 (to K.M.H.), the Fonds de recherche du Québec – Santé grant #32598 (to K.M.H.), and the Canada Foundation for Innovation John Evans Leader Fund grant #31377 (to K.M.H. and S.S.). K.M.H. is Chercheur-Boursier (Junior 1) of the Fonds de recherche du Québec – Santé. AH was partly supported by an Imperial Tobacco scholarship from the Fondation Universitaire Armand-Frappier Institut National de la Recherche Scientifique and Center for Host-Parasite interactions (CHPI).

#### **Author contributions**

SS and AH conceived the study; AH and BMA performed experiments; AH, BMA, SS, KMH analysed and interpreted data; SS and AH wrote the manuscript; all authors edited and approved the manuscript.

Competing financial interests: The authors declare that they have no competing interests.

Figure 1. CD11c-specific HIF-1*a* ablation results in lower parasite burdens in the spleen and bone marrow. *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre*<sup>-</sup> (WT) and *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre*<sup>+</sup> (KO) mice were infected with  $2x10^7$  amastigotes intravenously. (A) Graph represents the splenic parasite burden expressed as Leishman Donovan Units (LDU) at various time points after infection. (B) Bone marrow parasite burden, determined by limiting dilutions. (C) Liver parasite burden (LDU). (D-F)  $2x10^4$  OT-I CD8 T cells were adoptively transferred into recipient mice a day prior to infection with ovalbumin-transgenic (PINK) *L. donovani* amastigotes. (D) Graph represents the percentage of OT-I CD8 T cells found in the spleen from *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre*<sup>-</sup> and *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre*<sup>+</sup> mice over the course of infection. (E) The average number of OT-I CD8 T cells. (F) The frequency of IFN $\gamma^+$  OT-I CD8 T cells. All data represent mean ± SEM of one of 3 independent experiments, n = 4.

Figure 2. HIF-1*a* expression in CD11c<sup>+</sup> cells limits expansion of Th1 cells during chronic visceral leishmaniasis.  $Hif-1\alpha^{flox/flox}Cd11c-Cre^-$  (WT) and  $Hif-1\alpha^{flox/flox}Cd11c-Cre^+$  (KO) mice were infected with 2x10<sup>7</sup> amastigotes intravenously. (A) Graph represents the frequency and (B) absolute numbers of splenic CD4 T cells. (C) Representative FACS plots for IFN $\gamma^+$ CD4 T cells of  $Hif-1\alpha^{flox/flox}Cd11c-Cre^-$  (upper panels) and  $Hif-1\alpha^{flox/flox}Cd11c-Cre^+$  mice (lower panels) in the spleen. (D) Percentage and (E) mean fluorescence intensity (MFI) of IFN $\gamma^+$ CD4 T cells in the spleen. Frequency (F) and numbers (G) of IFN $\gamma^+$ IL-10<sup>+</sup> double producing CD4 T cells;

percentage (H) and numbers (I) of IL-10<sup>+</sup> single producers CD4 T cells in the spleen over the course of infection. All data represent mean  $\pm$  SEM of one of 3 independent experiments, n = 4.

Figure 3. HIF-1*a* deficiency in CD11c<sup>+</sup> cells results in stronger Th1 responses in the bone marrow. *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre<sup>-</sup>* (WT) and *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre<sup>+</sup>* (KO) mice were infected with  $2x10^7$  LV9 amastigotes intravenously. (A) Graph represents the frequency and (B) absolute numbers of bone marrow CD4 T cells. (C) Representative FACS plots for IFN $\gamma^+$ CD4 T cells of *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre<sup>-</sup>* (upper panels) and *Hif-1a*<sup>flox/flox</sup>*Cd11c-Cre<sup>+</sup>* mice (lower panels) in the bone marrow. (D) Percentage and (E) mean fluorescence intensity (MFI) of IFN $\gamma^+$ CD4 T cells in the bone marrow. Frequency (F) and numbers (G) of IFN $\gamma^+$ IL-10<sup>+</sup> double producing CD4 T cells; percentage (H) and numbers (I) of IL-10<sup>+</sup> single producers CD4 T cells in the bone marrow over the course of infection. All data represent mean ± SEM of one of 3 independent experiments, n = 4.

Figure 4. Dendritic cell migration to the spleen is not affected by the absence of HIF-1a.  $Hif-1a^{flox/flox}Cd11c-Cre^{-}$  (WT) and  $Hif-1a^{flox/flox}Cd11c-Cre^{+}$ (KO) mice were infected with 2x10<sup>7</sup> LV9 amastigotes intravenously. (A) Representative plots showing splenic CD11c<sup>hi</sup> DCs of  $Cre^{-}$ (upper panels) and  $Cre^{+}$  (lower panels) mice over the course of infection. Graphs represent the frequency (B) and absolute numbers (C) of CD11c<sup>hi</sup>MHCII<sup>hi</sup> cells in the spleen. (E-F) Frequency of splenic CD11c<sup>hi</sup>MHCII<sup>hi</sup>CD4<sup>+</sup> (D) and CD11c<sup>hi</sup>MHCII<sup>hi</sup>CD8<sup>+</sup> (E) cells. (G-H) Representative plots (G) and percentages (H) of DNGR-1<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> dendritic cells. (H-I) Representative plots (I) and percentages (J) of DNGR-1<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> dendritic cells. All data represent mean  $\pm$  SEM of one of 3 independent experiments, n = 4.

**Figure 5. HIF-1** $\alpha$  expression alters DC functions. Mice were infected with 2x10<sup>7</sup> amastigotes intravenously. Real-time PCR analysis of HIF-1 $\alpha$  (A), IL-12p35 (B), IL-12p40 (C), IL-10 (D), and TNF (E) expression in splenic DCs from *Hif-1\alpha^{flox/flox}Cd11c-Cre^-* (WT) and *Hif-1\alpha^{flox/flox}Cd11c-Cre^+* (KO) mice over the course of infection. Gene fold increase was referred to *Hprt* reporter gene. All data represent mean ± SEM combined from 2 independent experiments.









B)





E)



■ Hif-1a<sup>nox/nox</sup>-Cre <sup>-</sup>
□ Hif-1a<sup>nox/nox</sup>-Cre <sup>+</sup>







F)










821

2º

S

H)

% BM IL-10<sup>+</sup> CD4 T cells

2.0

1.5

1.0

0.5 0.0

NA



I)





85



25-

20







A)





C)



D)

B)







■ Hif-1a<sup>flox/flox</sup>-Cre -□ Hif-1a<sup>flox/flox</sup>-Cre + Supplemental Figure 1

"HIF-1α hampers dendritic cell function and Th1 generation during chronic visceral leishmaniasis" Akil Hammami, Belma Melda Abidin, Krista M. Heinonen, and Simona Stäger



Supplemental Figure 1. Real-time PCR analysis of HIF-1 $\alpha$  (A), IL-12p35 (B), IL-12p40 (C), IL-10 (D), and TNF (E) expression in splenic DCs from naive *Hif-1\alpha^{flox/flox}Cdllc-Cre^-* (WT) mice (pool of 3 mice) and *Hif-1\alpha^{flox/flox}Cdllc-Cre^+* (KO) naive mice.

## **Discussion générale**

## Discussion

#### 1. Le rôle de HIF-1α dans les cellules dendritiques durant la LV aigüe

Les microorganismes pathogènes ont développé une multitude de mécanismes complexes dans le but d'échapper aux réponses immunitaires de l'hôte. Le parasite de *Leishmania donovani*, l'agent causatif de la leishmaniose viscérale, représente un modèle d'étude intéressant puisque il établit une infection chronique chez les patients. Ainsi, l'exacerbation de la maladie semble fatale. Les tissus infectés sont pourvus d'un microenvironnement inflammatoire assez particulier qui est impliqué directement dans le façonnage de la réponse immunitaire. Dans cette étude, on a démontré que le milieu inflammatoire induit par le parasite au début de l'infection, dépend de l'activation du facteur de transcription responsable de la régulation des interférons IRF-5. Ce milieu inflammatoire inhibe l'expansion des cellules T CD8 ainsi que le développement de leur fonction effectrice en devenant des précurseurs de mémoires (MPEC) à travers l'induction du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  dans les cellules dendritiques. HIF-1 $\alpha$  affecte les DCs et altère leurs fonctions. Par conséquent, la déplétion conditionnelle de ce facteur dans la population cellulaire exprimant le marqueur CD11c, entraîne une réduction significative de la charge parasitaire de la rate durant la phase aigüe de l'infection.

Les réponses des cellules T CD8 sont essentielles pour éliminer les pathogènes intracellulaires. Suite à une infection, les cellules spécifiques pour l'Ag subissent une multiplication massive et acquièrent des fonctions effectrices nécessaires pour accomplir leurs tâches. L'activation des cellules T nécessite 3 signaux, à savoir, la transduction du signal du TCR et celles des molécules de co-stimulation ainsi que l'activation par les cytokines inflammatoires. Le rôle des cytokines inflammatoires sur les cellules T semble plus complexe, en effet, elles permettent de moduler et soutenir leur différenciation, leur expansion et leur survie. De plus, ces cytokines inflammatoires affectent le microenvironnement dans lequel se déroulent les réponses anti-microbiennes. La nature de cette inflammation dicte d'une façon critique le genre de réponses engendrées. En effet, dans plusieurs modèles d'infection aigües tels que *Listeria monocytogenes* ou *Toxoplasma gondii*, l'IL-12 est essentielle pour l'acquisition des fonctions effectrices des cellules T CD8 (Ohteki et al., 1999 ; Wilson et al., 2010). L'IL-12 inhibe le facteur de transcription EOMES en faveur de l'activation du facteur T-bet responsable d'induire et maintenir l'efficacité des cellules

T CD8. En revanche, dans d'autres modèles comme celui du LCMV, la cytokine inflammatoire dominante est plutôt l'interféron de type I. IFN I est responsable de l'activation et du maintien des fonctions effectrices des cellules T CD8 dans ce cas (Aichele et al., 2006). Cela pourrait indiquer que le destin des cellules T CD8 dépend le plus de la composition du milieu inflammatoire que de l'inflammation elle-même.

A travers plusieurs modèles d'infection, on constate que chaque pathogène induit une réponse inflammatoire différente des autres et spécifique à lui-même. Ces réponses sont généralement gouvernées par la famille des facteurs IRF. Nos données démontrent que l'inflammation induite durant la phase aigüe de l'infection par *L. donovani* est néfaste pour l'acquisition des réponses protectrices des cellules T CD8 et elle est médiée par IRF-5.

IRF-5 est impliqué dans l'activation du gène d'IFN I ainsi que des gènes codant pour des cytokines inflammatoires tels que l'IL-12, l'IL-6 et le TNF. On a démontré dans une étude antérieure en utilisant des souris déficientes de IRF-5 que ce facteur est essentiel pour le développement des réponses Th1 protectrices durant la phase chronique de l'infection par *L. donovani* (Paun et al., 2011). Alors que dans cette étude et tout au début de l'infection, on a montré que le parasite utilise la voie de l'IRF-5 aussi pour induire une production massive de la cytokine inflammatoire TNF qui sera responsable de la destruction de la structure de la rate dans un stade plus avancé de l'infection (Engwerda et al., 2002). De ce fait, on pourrait conclure quant au double rôle de l'IRF-5 qui affecte le microenvironnement inhibitoire pour les cellules T CD8, ainsi conduisant à la chronicité de l'infection.

Les réponses inflammatoires déclenchées par le système immunitaire suite à la pénétration d'un agent pathogène affecte l'hôte surtout quand l'inflammation engendrée est assez forte. Cette forte inflammation est souvent néfaste pour les tissus dans lesquels elle prend lieu. Plusieurs mécanismes sont envisagés par l'hôte afin de faire face à cette situation et limiter l'inflammation et ses dégâts ainsi que protéger le tissu. La voie de l'hypoxie adénosinergique est une des voies qui permettent la protection des tissus. Elle représente une réponse physiologique aux dégâts inflammatoires, à la diminution du niveau d'oxygène ainsi qu'à l'accumulation de l'adénosine extracellulaire. HIF-1 $\alpha$  est le régulateur clé des réponses cellulaires en état d'hypoxie. Cette voie, une fois activée, permet non seulement, la survie des cellules dans un environnement hypoxique, qui est une caractéristique typique des tissus inflammés, mais aussi cette voie

conduit à la suppression des réponses pro-inflammatoires (Sitkovsky and Lukashev, 2005). En effet, HIF-1α inhibe la production des cytokines et molécules inflammatoires dans les cellules T, induit la prolifération des cellules Treg ainsi que la sécrétion de la cytokine anti-inflammatoire l'IL-10. De plus HIF-1 $\alpha$  inhibe la maturation des DCs (Mancino et al., 2008). Par ailleurs, l'expression de HIF-1a dans les macrophages associés aux tumeurs augmente leur suppression par les cellules T (Colegio et al., 2014). HIF-1α n'est pas régulé à la hausse et stabilisé seulement sous hypoxie, mais aussi dans un contexte inflammatoire sous normoxie. En effet, des cytokines inflammatoires telles que TNF et IL-1 $\beta$  ou des agonistes de TLR peuvent induire sa surexpression. De plus, plusieurs pathogènes viraux, bactériens et parasitaires peuvent l'induire également de manière directe (Kilani et al., 2004 ; Nizet and Johnson, 2009 ; Peyssonnaux et al., 2005; Brown et al., 2014). Récemment, il a été démontré aussi que les promastigotes de *Leishmania* induisent l'expression et la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les macrophages *in vitro* (Singh et al., 2012). Nos résultats confirment aussi l'induction de la transcription de HIF-1α dans des BMDC par les amastigotes de L. donovani. Cependant, le HIF-1 $\alpha$  ne semble pas nécessaire pour la survie des amastigotes dans les DCs in vivo car on n'observe pas de différence entre les cellules déficientes ou pas en HIF-1a. Notre étude plus approfondie suite à une infection indique que l'induction de HIF-1α dans les DCs est dépendante de l'IRF-5. Au début de l'infection HIF-1α est induit dans les DCs principalement par le milieu inflammatoire et non pas par le parasite puisque son niveau d'ARNm dans les deux groupes de BMDC sauvage et knock-out infectés par les amastigotes est similaire. Cependant, les facteurs responsables de l'induction de HIF-1α dans les DCs, restent inconnus.

A travers la littérature, on constate que HIF-1 $\alpha$  pourrait avoir un double rôle dans les lignées myéloïdes soumises à un milieu inflammatoire. En effet, ce facteur est critique pour la défense de l'hôte et l'élimination des bactéries pathogènes. De plus, les macrophages phagocytent et éliminent plus efficacement les bactéries infectieuses en présence de HIF-1 $\alpha$  dans un milieu hypoxique. De ce fait, il est plus évident que les souris, dont la déplétion spécifique du gène du HIF-1 $\alpha$  dans les lignées myéloïdes, sont plus susceptibles à l'infection et ont du mal à résoudre la réplication des bactéries envahissantes (Cramer et al., 2003 ; Peyssonnaux et al., 2005). En revanche, dans d'autres modèles d'infection virale, il a été démontré que ce facteur de transcription est impliqué dans l'amélioration de la réplication de quelques virus (Tomaskova et al., 2011 ; Vassilaki et al., 2013). Quant aux infections parasitaires, comme celles par

*Toxoplasma gondii* ou les promastigotes de *Leishmania*, le rôle de HIF-1 $\alpha$  semble déterminant pour la survie et le développement des parasites à l'intérieur des cellules hôtes (Degrossoli et al., 2011, singh et al., 2012). Les tumeurs sont encore plus intéressantes du point de vue de la complexité de leur microenvironnement essentiellement hypoxique. Dans de telles circonstances, l'expression du HIF-1 $\alpha$  dans les macrophages associés à la tumeur induit la régulation à la hausse de l'arginase-1 et par la suite l'activation non classique de ces cellules. De plus, HIF-1 $\alpha$ amplifie les effets inhibiteurs des cellules suppresseurs dérivées de la lignée des myéloïdes (MDSC) et entraîne la suppression des réponses des cellules T (Colegio et al., 2014 ; Corzo et al., 2010 ; Doedens et al., 2010).

Les DCs sont des cellules professionnelles de la présentation antigénique, leur rôle est primordial dans l'initiation et le maintien des réponses d'immunité adaptative. La surexpression et la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans cette population démontre des effets divergents. Bien que HIF-1 $\alpha$ semble être critique pour la différenciation et la migration des DCs dans un environnement hypoxique, ce facteur de transcription inhibe la régulation à la hausse de la chimiokine CCR7 qui est impliqué dans la direction des DCs matures vers les organes lymphoïdes secondaires (Kohler et al., 2012 ; Mancino et al., 2008). D'une façon intéressante, nos résultats indiquent que HIF-1 $\alpha$  affecte aussi les fonctions des DCs durant la phase aigüe de la leishmaniose viscérale. En effet, et bien que habituellement L. donovani induit une production de L'IL-12 qui se limite aux premières 24h post infection, (Engwerda et al., 1998), les DCs déficientes en HIF-1a soutiennent l'expression de l'IL-12p35 avec une diminution dramatique du niveau de l'expression de l'IL-10. Cela nous permet de conclure que HIF-1a régule, d'une façon ou d'une autre, l'équilibre de sécrétion des cytokines inflammatoires / anti-inflammatoires dans les DCs. De plus, l'augmentation de l'expression de l'IL-12p35 corrèle bien avec l'augmentation de l'expansion des cellules T CD8 effectrices spécifiques pour l'antigène de Leishmania observé dans les souris déficientes en HIF-1a dans les DCs.

L'ensemble de ces résultats nous a permis de tracer un mécanisme d'induction de HIF-1 $\alpha$  dans les DCs, qualifié d'une réaction physiologique qui affecte la fonction des cellules présentatrices d'Ag ainsi que les réponses des cellules T CD8 en faveur du développement du parasite durant la phase aigüe.



**Figure 1 :** Schéma récapitulatif du rôle de l'inflammation mediée par IRF-5 ainsi que le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  dans les cellules dendritiques durant la phase aigüe de la leishmaniose viscérale

#### 2. Le rôle de HIF-1a dans les cellules myéloïdes durant la LV chronique

Le stade chronique plus avancé de l'infection est caractérisé par une expansion dramatique de la charge parasitaire, d'une splénomégalie accompagnée d'une microarchitecture détruite de la rate. Cela accentue encore l'effet du microenvironnement qui devient plus favorable à la stabilisation du HIF-1 $\alpha$  ainsi qu'à l'immunosuppression.

Dans ce contexte, notre étude révèle que la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  dans les DCs durant la phase chronique de l'infection entraîne une diminution de l'expression de l'IL-12 en faveur de la production de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. De ce fait, la déplétion de HIF-1 $\alpha$  permet l'amélioration des réponses des cellules T CD4 productrices de l'IFN<sub>Y</sub> ainsi qu'un meilleur contrôle de la charge parasitaire aussi bien dans la rate que dans la moelle osseuse.

Durant la phase chronique de l'infection par *L. donovani*, le parasite affecte la rate et la moelle osseuse. Cela engendre un microenvironnement inflammatoire chronique avec un caractère hypoxique plus prononcé en comparaison avec la phase aigüe. Bien que l'inflammation soit nécessaire au déclenchement et au maintien des réponses des cellules T, Stelekati et ses collaborateurs ont souligné dans d'autres modèles qu'un tel milieu inflammatoire chronique peut affecter négativement ces réponses (Stelkati et al., 2014). D'une manière plus détaillée, le parasite induit un niveau plus élevé de la cytokine inflammatoire TNF (Hammami et al., 2015) qui sera responsable de la destruction de l'architecture de la rate. Cette destruction commence à environ 14 jours post-infection et entraîne un désordre fonctionnel et migratoire pour les cellules immunitaires face au pathogène (Kaye et Scott, 2011). Une telle situation est assez favorable à la la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  accompagnée d'une immunosuppression (Charpentier et al., 2016). Comme pour la phase aigüe de l'infection, la stabilisation de HIF-1 $\alpha$  durant la phase chronique semble être une réaction physiologique afin de contrarier la forte inflammation chronique et limiter les dégâts générés dans le tissu afin que les cellules puissent surmonter cette condition non habituelle.

La déplétion ciblée de HIF-1 $\alpha$  dans les DCs permet une importante diminution de la charge parasitaire dans les souris infectées. Les cellules T CD8 ne semblent pas impliquées dans l'élimination du parasite puisque elles sont complètement épuisées durant la phase chronique (Joshi et al., 2009). En revanche, les réponses Th1 qui présentent un pic d'expansion environ 4

semaines post-infection (Kaye et al., 2004) sont largement affectées par l'absence de HIF-1 $\alpha$  dans les DCs. En effet, les souris déficientes en HIF-1 $\alpha$  présentent, non seulement, une augmentation dans l'expansion des cellules T CD4 mais aussi une amélioration de leur fonction donnant une fréquence significativement plus élevée des cellules qui produisent de l'IFN<sub>Y</sub> aussi bien dans la rate que dans la moelle osseuse. Ce résultat intéressant, nous permet de conclure que l'amorçage des cellules T CD4 Th1 est non pas plus efficace, mais ainsi, bien maintenues par les DCs déficientes en HIF-1 $\alpha$ .

Bien que l'altération des capacités migratoires des cellules myéloïdes dépourvues de HIF-1 $\alpha$  soit déjà rapportée dans la littérature (Cramer et al., 2003), nos études plus approfondies des DCs, ne nous ont révélées aucune différence ni dans le nombre, ni dans la fréquence de ces cellules dans la rate des deux groupes de souris sauvages et déficientes en HIF-1α. Le profil des Th1 semble plutôt être le résultat d'une amélioration fonctionnelle des cellules présentatrices d'antigène dans un environnement inflammatoire chronique. En effet, HIF-1α est un des facteurs qui régule l'expression de la chimiokine CCR7 responsable de la migration des DCs vers la rate. Durant la leishmaniose viscérale, la migration des DCs est assurée d'une part, par l'expression du CCR7 qui est inhibée par la cytokine anti-inflammatoire IL-10 et d'autre part par les ligands CCL19/21 de CCR7. Ces ligands sont produits par les cellules endothéliales et stromales de la rate (Ato et al., 2006). Vers la phase chronique de la maladie dans les souris sauvages, ces cellules stromales sont mortes en causant la dissociation de l'architecture du tissu ainsi que l'arrêt de la production des ligands CCL19/21 (Engwerda et al., 2002). Cependant, les résultats des coupes de rate des souris knock-out nous montrent clairement que la microarchitecture de la rate reste relativement intacte à cause de la diminution de la production de TNF. Cette constatation fascinante nous permet de déduire que les DCs continuent de franchir la rate d'une façon fonctionnelle.

Les DCs déficientes en HIF-1 $\alpha$  expriment un niveau significativement plus élevé d'IL-12p35 et p40 alors que l'expression de l'IL-10 reste restreinte par rapport aux cellules des souris sauvages. L'IL-12 produite par les DCs est assez critique aussi bien pour les cellules T CD8 durant la phase aigüe de l'infection (Hammami et al., 2015) que pour les cellules T CD4 Th1 durant la phase chronique. Alors la déplétion de HIF-1 $\alpha$  améliore la capacité des DCs à réguler à la baisse l'IL-10 en faveur d'une sécrétion soutenue durant l'infection de l'IL-12 permettant ainsi d'amorcer et soutenir les cellules Th1 fonctionnelles dans un environnement inflammatoire chronique afin de produire de l' $INF_{\Upsilon}$  nécessaire pour les autres lignées myéloïdes dans leur combat contre le pathogène de *L. donovani*.

L'amélioration des réponses des Th1 durant la phase chronique de la LV est essentielle pour l'élimination du parasite et durant cette phase, on constate également une augmentation intense de la myelopoièse dans la rate des souris sauvages entraînant une splénomégalie. La différence énorme entre la charge parasitaire de la rate et dans la moelle osseuse des souris sauvages et celle des souris déficientes en HIF-1 $\alpha$  dans les populations qui expriment le marqueur CD11c, nous suggère un rôle primordial de ce facteur de transcription. L'intégrine CD11c est exprimée entre autre, dans les DCs, les macrophages activés et les monocytes inflammatoires. Nos résultats démontrent que la surexpression et la stabilisation de HIF-1a dans un microenvironnement inflammatoire chronique affecte la myelopoièse et entraîne la production de monocytes régulateurs dans la moelle osseuse plus susceptibles à l'envahissement du parasite. Une fois arrivées dans la rate, les cellules myéloïdes acquièrent un phénotype semblable au MDSC et exercent des fonctions inhibitrices pour les cellules T d'une manière dépendante de HIF-1 $\alpha$ . De plus, HIF-1a permet la polarisation des macrophages vers un phénotype similaire à celui des M2 avec une signature dominée par la régulation à la hausse de l'expression de l'arginase1 ainsi que l'IL-10. Cette activation non classique induit davantage la susceptibilité face au parasite des monocytes qui sont dans un stade intermédiaire en cours de différenciation.

Durant la phase chronique de la LV, les réponses des cellules myéloïdes sont déclenchées. La production des cellules myéloïdes augmente dans la moelle osseuse à travers la stimulation de la production du GM-CSF par le parasite (Cotterell et al., 2000). De plus, la myelopoièse extra médullaire s'intensifie largement dans la rate (Cotterell et al., 2000). D'une façon plus détaillée, on observe une augmentation significative des cellules précurseurs de granulocytes et monocytes (GMP) dans la moelle ce qui entraîne une sortie massive des monocytes Ly6C<sup>hi</sup>. La régulation à la hausse de Sca-1 et CMH-II, qui sont des marqueurs associés au phénotype régulateur (Askenase et al., 2015) dans les monocytes inflammatoires, nous révèle le rôle de l'IFN<sub>Y</sub> produit par les cellules T CD4 Th1 à ce stade de l'infection. En effet, il semble que les Th1 et à travers l'IFN<sub>Y</sub>, amorcent les monocytes Ly6C<sup>hi</sup> pour des fonctions régulatrices dans la moelle osseuse menant à une augmentation de l'envahissement du parasite (Abidin et al., 2017). D'une manière assez surprenante, les fonctions régulatrices des monocytes néo-produits sont complètement

indépendantes de HIF-1 $\alpha$  puisque les cellules issues des deux groupes de souris présentent le même niveau d'infection. En revanche, HIF-1 $\alpha$  s'implique d'une manière étroitement liée à l'acquisition des fonctions inhibitrices lors de la différenciation de ces monocytes en macrophages. Dans ce contexte, on peut extrapoler l'adaptation au micro-environnement hypoxique des monocytes humains sur les monocytes amorcés par l'IFN<sub>Y</sub> du modèle murin. Par ailleurs, Fangradt et ses collaborateurs ont démontré que sous hypoxie, les monocytes humains subissent une adaptation via la signalisation du facteur nucléaire NFkB1. C'est bien qu'au stade de différenciation vers des macrophages que HIF-1 $\alpha$  prend la relève afin d'induire une cascade de changements fonctionnels et métaboliques (Fangradt et al., 2012). Ce concept nous permet de déduire que le parasite induit une sortie massive de monocytes inflammatoires de la moelle osseuse. Ces monocytes sont caractérisés par un phénotype régulateur indépendamment de HIF-1 $\alpha$ , destinés à jouer un rôle de cible favorable pour le pathogène.

La myélopoièse active permet d'induire une multitude de populations hétérogènes souvent dotées de signatures de MDSC. Les MDSC étaient largement étudiées dans les tumeurs et partagent une fonction commune permettant l'inhibition de la prolifération et l'activité effectrice des cellules T. Ces cellules myéloïdes sont réparties sur deux grandes sous populations à savoir les Monocytes-MDSC (Mo-MDSC) avec l'expression de LyC6<sup>hi</sup> et Ly6C<sup>lo/int</sup> ainsi que les granulocytes poly-morpho-nucléaires-MDSC (PMN-MDSC) exprimant Ly6G<sup>hi</sup>Ly6C<sup>+</sup> (Bronte et al., 2016). Les MDSC sont aussi présentes dans les modèles d'infection parasitaire et bien que dans l'infection avec Heligmosomoides polygyrus, elles partagent les mêmes caractéristiques inhibitrices que celle des tumeurs (Valanparambil et al., 2016), elles semblent jouer un rôle protecteur lors de la leishmaniose cutanée causée par L. major même en supprimant les Th1 (Pereira et al., 2011). Nos résultats indiquent que ces cellules myéloïdes préalablement purifiées provenant des souris infectées chroniquement au jour 28 post-infections avec L. donovani, sont plutôt inhibitrices. En effet, elles sont capables de réduire la production de l'IFN $_{\rm Y}$  par les cellules T CD4 stimulées non spécifiquement via CD3/CD28. Alors que lorsqu'elles sont purifiées durant la phase aigüe à partir des souris qui n'ont pas encore développées de splénomégalie accompagnée d'une destruction de l'architecture de la rate et avant l'acquisition de leur phénotype, elles ne démontrent aucun effet suppresseur. Durant la LV chronique, la suppression des Th1 fonctionnelles dépend de l'expression et de la stabilisation de HIF-1 $\alpha$ . En outre, les MDSC déficientes en HIF-1a perdent largement leur effet inhibiteur. HIF-1a est un facteur

critique lors des tumeurs vu le microenvironnement particulier où il permet d'améliorer la différenciation des MDSC (Corzo et al., 2010; Deodens et al., 2010). Différents mécanismes confèrent au MDSC leurs activités suppressives notamment, la régulation à la hausse de PD-L1, l'induction de l'IL-10, la sécrétion des NO ou ROS et même une augmentation du niveau de l'activité de l'arginase1 (Bronte et al., 2016). L'ensemble de ces constatations nous permet de déduire l'implication du microenvironnement chronique dans le devenir fonctionnel des cellules myéloïdes.

Dans la LV chronique, l'expansion de la charge parasitaire de la rate et de la moelle osseuse reflète la nature des cellules myéloïdes différenciées en macrophages en tant que cibles préférées pour le pathogène. En effet, ces cellules sont non seulement dotées des fonctions inhibitrices mais aussi deviennent largement permissives pour l'infection. En outre, les macrophages activés alternativement, en absence de l'IFN-y, sont incapables d'éliminer le parasite (Holscher et al., 2006) et récemment, il a été montré que ces cellules qui sont dotées d'un phénotype M2 sont associées à la leishmaniose dermique de post Kala-azar (Mukhopadhyay et al., 2015). Dans ce contexte, nous avons détecté un niveau d'expression plus élevé des marqueurs liés au phénotype M2 des macrophages. En revanche, et d'une façon surprenante, les cellules dépourvues conditionnellement de HIF-1a démontrent un niveau d'expression plus atténué pour ces marqueurs durant la phase chronique, impliquant un rôle primordial de HIF-1 $\alpha$  dans l'induction et l'acquisition d'un phénotype de macrophages qui ressemble aux M2. La polarisation des macrophages en M2 a été décrite aussi dans le modèle de carcinome de poumon de Lewis. En effet, la différenciation de macrophages associés à la tumeur en phénotype M2 était dépendante de HIF-1a qui était induit par l'accumulation de l'acide lactique dans le milieu extracellulaire suite à une glycolyse anaérobique (Colegio et al., 2014). Par analogie, dans notre modèle, on observe une concentration de lactate intracellulaire significativement plus élevée dans les cellules de la rate des souris sauvages par rapport aux souris déficientes en HIF-1a. Cette observation pourrait nous donner une idée sur la voie d'induction de ce facteur clé. De plus, nous avons constaté une concentration moins élevée de glucose dans les cellules dépourvues de HIF- $1\alpha$ , ce qui pourrait témoigner d'une activité métabolique plus vive. Par ailleurs, le glucose et la glycolyse sont essentiels pour le soutien des fonctions inflammatoires pour plusieurs lignées de cellules immunitaires et la déplétion de glucose dans un micro-environnement pathologique est associée aux réponses inflammatoires défectueuses. Cependant, une récente étude démontre

qu'une concentration considérable de glucose semble être défavorable pour les fonctions inflammatoires des DCs permettant l'inhibition des réponses des cellules T. Dans ce contexte, HIF-1 $\alpha$  et iNOS coordonnent ensemble le métabolisme de ces cellules à travers la signalisation du complexe mTORC1 (Lawless et al., 2017). Cette constation pourrait bien expliquer la faible concentration de glucose dans les cellules myéloïdes déficientes en HIF-1 $\alpha$  durant la phase chronique de la LV. Finalement, L'IL-10, qui est largement abondante durant la phase chronique de l'infection, est un autre facteur suspecté d'inhiber le changement de la programmation métabolique des macrophages infectés issus des souris sauvages. Dans la rate, plusieurs cellules produisent l'IL-10, entre autres, les cellules B (Bankoti et al., 2012), les DCs (Svensson et al., 2004), les macrophages (Miles et al., 2005), les cellules NK (Maroof et al., 2008), les cellules Th1 (Stager et al., 2006), les cellules Tregs naturelles (Belkaid et al., 2002), ainsi qu'une autre population de CD4 caractéristiques de l'évolution de la maladie qui produit l'IL-10 simultanément avec l'IFN<sub>Y</sub> (Stager et al., 2006). Cette cytokine anti-inflammatoire inhibe la consommation du glucose et atténue la glycolyse permettant l'accélération de la phosphorylation oxydative dont le lactate est un de ces produits (Eddie et al., 2017).

En conclusion, l'ensemble de ces travaux souligne le rôle du micro-environnement induit par le parasite de *L. donovani* pour la décision de la nature des réponses immunitaires déclenchées. Et confirment que le parasite utilise une réponse physiologique induite par HIF-1 $\alpha$  afin de supprimer le système immunitaire et établir une infection chronique. Le facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  étant au centre de la coordination de l'activité de plusieurs molécules de signalisation ainsi que des cytokines, représenterait un potentiel candidat pour une éventuelle thérapie de la leishmaniose viscérale.



**Figure 2 :** Schéma récapitulatif du rôle du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  dans les cellules dendritiques durant la phase chronique de la leishmaniose viscérale.



**Figure 3 :** Schéma récapitulatif du rôle du facteur de transcription HIF-1 $\alpha$  dans les cellules myéloïdes durant la phase chronique de la leishmaniose viscérale.

# **Références bibliographiques**

### **Références bibliographiques**

- Aarup, A., Pedersen, T. X., Junker, N., Christoffersen, C., Bartels, E. D., Madsen, M., . . .
  Nielsen, L. B. (2016). Hypoxia-Inducible Factor-1alpha Expression in Macrophages
  Promotes Development of Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 36(9), 1782-1790. doi: 10.1161/ATVBAHA.116.307830
- Abidin, B. M., Hammami, A., Stager, S., & Heinonen, K. M. (2017). Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog*, 13(8), e1006422. doi: 10.1371/journal.ppat.1006422
- Aichele, P., Unsoeld, H., Koschella, M., Schweier, O., Kalinke, U., & Vucikuja, S. (2006). CD8 T cells specific for lymphocytic choriomeningitis virus require type I IFN receptor for clonal expansion. *J Immunol*, 176(8), 4525-4529.
- Alexander, J., & Russell, D. G. (1992). The interaction of Leishmania species with macrophages. *Adv Parasitol*, *31*, 175-254.
- Amprey, J. L., Im, J. S., Turco, S. J., Murray, H. W., Illarionov, P. A., Besra, G. S., . . . Spath, G. F. (2004). A subset of liver NK T cells is activated during Leishmania donovani infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. J Exp Med, 200(7), 895-904. doi: 10.1084/jem.20040704
- Anderson, C. F., Oukka, M., Kuchroo, V. J., & Sacks, D. (2007). CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *J Exp Med*, 204(2), 285-297. doi: 10.1084/jem.20061886
- Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T., & Courret, N. (1998). The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbour Leishmania in murine macrophages. *Trends Microbiol*, 6(10), 392-401.
- Arany, Z., Huang, L. E., Eckner, R., Bhattacharya, S., Jiang, C., Goldberg, M. A., . . . Livingston, D. M. (1996). An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(23), 12969-12973.
- Arena, E. T., Tinevez, J. Y., Nigro, G., Sansonetti, P. J., & Marteyn, B. S. (2017). The infectious hypoxia: occurrence and causes during Shigella infection. *Microbes Infect*, 19(3), 157-165. doi: 10.1016/j.micinf.2016.10.011

- Ashford, R. W. (2000). The leishmaniases as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol,* 30(12-13), 1269-1281.
- Askenase, M. H., Han, S. J., Byrd, A. L., Morais da Fonseca, D., Bouladoux, N., Wilhelm, C., . .
  Belkaid, Y. (2015). Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity*, 42(6), 1130-1142. doi: 10.1016/j.immuni.2015.05.011
- Ato, M., Maroof, A., Zubairi, S., Nakano, H., Kakiuchi, T., & Kaye, P. M. (2006). Loss of dendritic cell migration and impaired resistance to Leishmania donovani infection in mice deficient in CCL19 and CCL21. *J Immunol*, 176(9), 5486-5493.
- Ato, M., Stager, S., Engwerda, C. R., & Kaye, P. M. (2002). Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol*, 3(12), 1185-1191. doi: 10.1038/ni861
- Bankoti, R., Gupta, K., Levchenko, A., & Stager, S. (2012). Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection. *J Immunol*, 188(8), 3961-3971. doi: 10.4049/jimmunol.1102880
- Banuls, A. L., Hide, M., & Prugnolle, F. (2007). Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*, 64, 1-109. doi: 10.1016/S0065-308X(06)64001-3
- Bates, P. A. (2007). Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol, 37*(10), 1097-1106. doi: 10.1016/j.ijpara.2007.04.003
- Beattie, L., Svensson, M., Bune, A., Brown, N., Maroof, A., Zubairi, S., . . . Kaye, P. M. (2010).
  Leishmania donovani-induced expression of signal regulatory protein alpha on Kupffer cells enhances hepatic invariant NKT-cell activation. *Eur J Immunol, 40*(1), 117-123. doi: 10.1002/eji.200939863
- Belkaid, Y., Butcher, B., & Sacks, D. L. (1998). Analysis of cytokine production by inflammatory mouse macrophages at the single-cell level: selective impairment of IL-12 induction in Leishmania-infected cells. *Eur J Immunol*, 28(4), 1389-1400. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199804)28:04<1389::AID-IMMU1389&#62;3.0.CO;2-1
- Belkaid, Y., Piccirillo, C. A., Mendez, S., Shevach, E. M., & Sacks, D. L. (2002). CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. *Nature*, 420(6915), 502-507. doi: 10.1038/nature01152

- Belkaid, Y., & Rouse, B. T. (2005). Natural regulatory T cells in infectious disease. *Nat Immunol*, 6(4), 353-360. doi: 10.1038/ni1181
- Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., . . . Sacks, D. (2002).
  CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with Leishmania major. *J Immunol*, *168*(8), 3992-4000.
- Ben-Shoshan, J., Afek, A., Maysel-Auslender, S., Barzelay, A., Rubinstein, A., Keren, G., & George, J. (2009). HIF-1alpha overexpression and experimental murine atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 29(5), 665-670. doi: 10.1161/ATVBAHA.108.183319
- Ben-Shoshan, J., Maysel-Auslender, S., Mor, A., Keren, G., & George, J. (2008). Hypoxia controls CD4+CD25+ regulatory T-cell homeostasis via hypoxia-inducible factor-1alpha. *Eur J Immunol*, 38(9), 2412-2418. doi: 10.1002/eji.200838318
- Berger, E. A., McClellan, S. A., Vistisen, K. S., & Hazlett, L. D. (2013). HIF-1alpha is essential for effective PMN bacterial killing, antimicrobial peptide production and apoptosis in Pseudomonas aeruginosa keratitis. *PLoS Pathog*, 9(7), e1003457. doi: 10.1371/journal.ppat.1003457
- Bern, C., Maguire, J. H., & Alvar, J. (2008). Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 2(10), e313. doi: 10.1371/journal.pntd.0000313
- Biedermann, T., Zimmermann, S., Himmelrich, H., Gumy, A., Egeter, O., Sakrauski, A. K., . . . Rocken, M. (2001). IL-4 instructs TH1 responses and resistance to Leishmania major in susceptible BALB/c mice. *Nat Immunol*, 2(11), 1054-1060. doi: 10.1038/ni725
- Birner, P., Schindl, M., Obermair, A., Plank, C., Breitenecker, G., & Oberhuber, G. (2000). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha is a marker for an unfavorable prognosis in early-stage invasive cervical cancer. *Cancer Res*, 60(17), 4693-4696.
- Blackwell, J. M., Searle, S., Goswami, T., & Miller, E. N. (2000). Understanding the multiple functions of Nramp1. *Microbes Infect*, 2(3), 317-321.
- Blum, J., Desjeux, P., Schwartz, E., Beck, B., & Hatz, C. (2004). Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. J Antimicrob Chemother, 53(2), 158-166. doi: 10.1093/jac/dkh058
- Bogdan, C., Moll, H., Solbach, W., & Rollinghoff, M. (1990). Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine

macrophages for elimination of Leishmania major amastigotes. *Eur J Immunol, 20*(5), 1131-1135. doi: 10.1002/eji.1830200528

- Bogdan, C., & Rollinghoff, M. (1998). The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. *Int J Parasitol*, 28(1), 121-134.
- Bronte, V., Brandau, S., Chen, S. H., Colombo, M. P., Frey, A. B., Greten, T. F., . . . Gabrilovich, D. I. (2016). Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nat Commun*, 7, 12150. doi: 10.1038/ncomms12150
- Brown, K. M., Suvorova, E., Farrell, A., McLain, A., Dittmar, A., Wiley, G. B., . . . Blader, I. J. (2014). Forward genetic screening identifies a small molecule that blocks Toxoplasma gondii growth by inhibiting both host- and parasite-encoded kinases. *PLoS Pathog*, *10*(6), e1004180. doi: 10.1371/journal.ppat.1004180
- Caldwell, C. C., Kojima, H., Lukashev, D., Armstrong, J., Farber, M., Apasov, S. G., & Sitkovsky, M. V. (2001). Differential effects of physiologically relevant hypoxic conditions on T lymphocyte development and effector functions. *J Immunol*, 167(11), 6140-6149.
- Campanelli, A. P., Roselino, A. M., Cavassani, K. A., Pereira, M. S., Mortara, R. A., Brodskyn,
  C. I., . . Silva, J. S. (2006). CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis*, 193(9), 1313-1322. doi: 10.1086/502980
- Cardoso, M. S., Silva, T. M., Resende, M., Appelberg, R., & Borges, M. (2015). Lack of the Transcription Factor Hypoxia-Inducible Factor 1alpha (HIF-1alpha) in Macrophages Accelerates the Necrosis of Mycobacterium avium-Induced Granulomas. *Infect Immun*, 83(9), 3534-3544. doi: 10.1128/IAI.00144-15
- Carlsen, E. D., Hay, C., Henard, C. A., Popov, V., Garg, N. J., & Soong, L. (2013). Leishmania amazonensis amastigotes trigger neutrophil activation but resist neutrophil microbicidal mechanisms. *Infect Immun*, 81(11), 3966-3974. doi: 10.1128/IAI.00770-13
- Carroll, V. A., & Ashcroft, M. (2005). Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev Mol Med*, 7(6), 1-16. doi: 10.1017/S1462399405009117

- Charpentier, T., Hammami, A., & Stager, S. (2016). Hypoxia inducible factor 1alpha: A critical factor for the immune response to pathogens and Leishmania. *Cell Immunol*, 309, 42-49. doi: 10.1016/j.cellimm.2016.06.002
- Clambey, E. T., McNamee, E. N., Westrich, J. A., Glover, L. E., Campbell, E. L., Jedlicka, P., . .
  Eltzschig, H. K. (2012). Hypoxia-inducible factor-1 alpha-dependent induction of FoxP3 drives regulatory T-cell abundance and function during inflammatory hypoxia of the mucosa. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(41), E2784-2793. doi: 10.1073/pnas.1202366109
- Colegio, O. R., Chu, N. Q., Szabo, A. L., Chu, T., Rhebergen, A. M., Jairam, V., . . . Medzhitov,
  R. (2014). Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature*, *513*(7519), 559-563. doi: 10.1038/nature13490
- Corzo, C. A., Condamine, T., Lu, L., Cotter, M. J., Youn, J. I., Cheng, P., . . . Gabrilovich, D. I. (2010). HIF-1alpha regulates function and differentiation of myeloid-derived suppressor cells in the tumor microenvironment. *J Exp Med*, 207(11), 2439-2453. doi: 10.1084/jem.20100587
- Cotterell, S. E., Engwerda, C. R., & Kaye, P. M. (1999). Leishmania donovani infection initiates T cell-independent chemokine responses, which are subsequently amplified in a T celldependent manner. *Eur J Immunol*, 29(1), 203-214. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199901)29:01<203::AID-IMMU203&#62;3.0.CO;2-B
- Cotterell, S. E., Engwerda, C. R., & Kaye, P. M. (2000a). Enhanced hematopoietic activity accompanies parasite expansion in the spleen and bone marrow of mice infected with Leishmania donovani. *Infect Immun, 68*(4), 1840-1848.
- Cotterell, S. E., Engwerda, C. R., & Kaye, P. M. (2000b). Leishmania donovani infection of bone marrow stromal macrophages selectively enhances myelopoiesis, by a mechanism involving GM-CSF and TNF-alpha. *Blood*, 95(5), 1642-1651.
- Cox, F. E. (2002). History of human parasitology. Clin Microbiol Rev, 15(4), 595-612.
- Cramer, T., Yamanishi, Y., Clausen, B. E., Forster, I., Pawlinski, R., Mackman, N., . . . Johnson,
  R. S. (2003). HIF-1alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell*, *112*(5), 645-657.

- Darrah, P. A., Patel, D. T., De Luca, P. M., Lindsay, R. W., Davey, D. F., Flynn, B. J., . . . Seder,
  R. A. (2007). Multifunctional TH1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against Leishmania major. *Nat Med*, *13*(7), 843-850. doi: 10.1038/nm1592
- Deak, E., Jayakumar, A., Cho, K. W., Goldsmith-Pestana, K., Dondji, B., Lambris, J. D., & McMahon-Pratt, D. (2010). Murine visceral leishmaniasis: IgM and polyclonal B-cell activation lead to disease exacerbation. *Eur J Immunol, 40*(5), 1355-1368. doi: 10.1002/eji.200939455
- Dedet, J., & Pratlong, F. (2000). [Taxonomy of Leishmania and geographical distribution of leishmaniasis]. Ann Dermatol Venereol, 127(4), 421-424.
- Degrossoli, A., Arrais-Silva, W. W., Colhone, M. C., Gadelha, F. R., Joazeiro, P. P., & Giorgio, S. (2011). The influence of low oxygen on macrophage response to Leishmania infection. *Scand J Immunol*, 74(2), 165-175. doi: 10.1111/j.1365-3083.2011.02566.x
- Depaquit, J., Leger, N., & Ferte, H. (1998). [The taxonomic status of Phlebotomus sergenti Parrot, 1917, vector of Leishmania tropica (Wright, 1903) and Phlebotomus similis Perfiliev, 1963 (Diptera - Psychodidae). Morphologic and morphometric approaches. Biogeographical and epidemiological corollaries]. *Bull Soc Pathol Exot*, 91(4), 346-352.
- Dereure, J., El-Safi, S. H., Bucheton, B., Boni, M., Kheir, M. M., Davoust, B., . . . Dedet, J. P. (2003). Visceral leishmaniasis in eastern Sudan: parasite identification in humans and dogs; host-parasite relationships. *Microbes Infect*, 5(12), 1103-1108.
- Dereure, J., Rioux, J. A., Gallego, M., Perieres, J., Pratlong, F., Mahjour, J., & Saddiki, H. (1991). Leishmania tropica in Morocco: infection in dogs. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 85(5), 595.
- Desjeux, P. (2001). The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 95(3), 239-243.
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 27(5), 305-318. doi: 10.1016/j.cimid.2004.03.004
- Doedens, A. L., Phan, A. T., Stradner, M. H., Fujimoto, J. K., Nguyen, J. V., Yang, E., . . . Goldrath, A. W. (2013). Hypoxia-inducible factors enhance the effector responses of CD8(+) T cells to persistent antigen. *Nat Immunol*, 14(11), 1173-1182. doi: 10.1038/ni.2714

- Doedens, A. L., Stockmann, C., Rubinstein, M. P., Liao, D., Zhang, N., DeNardo, D. G., . . . Johnson, R. S. (2010). Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression. *Cancer Res, 70*(19), 7465-7475. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1439
- Egners, A., Erdem, M., & Cramer, T. (2016). The Response of Macrophages and Neutrophils to Hypoxia in the Context of Cancer and Other Inflammatory Diseases. *Mediators Inflamm*, 2016, 2053646. doi: 10.1155/2016/2053646
- Elorza, A., Soro-Arnaiz, I., Melendez-Rodriguez, F., Rodriguez-Vaello, V., Marsboom, G., de Carcer, G., . . . Aragones, J. (2012). HIF2alpha acts as an mTORC1 activator through the amino acid carrier SLC7A5. *Mol Cell*, 48(5), 681-691. doi: 10.1016/j.molcel.2012.09.017
- Eltzschig, H. K., Bratton, D. L., & Colgan, S. P. (2014). Targeting hypoxia signalling for the treatment of ischaemic and inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 13(11), 852-869. doi: 10.1038/nrd4422
- Eltzschig, H. K., Eckle, T., Mager, A., Kuper, N., Karcher, C., Weissmuller, T., ... Colgan, S. P. (2006). ATP release from activated neutrophils occurs via connexin 43 and modulates adenosine-dependent endothelial cell function. *Circ Res*, 99(10), 1100-1108. doi: 10.1161/01.RES.0000250174.31269.70
- Engwerda, C. R., Ato, M., Cotterell, S. E., Mynott, T. L., Tschannerl, A., Gorak-Stolinska, P. M., & Kaye, P. M. (2002). A role for tumor necrosis factor-alpha in remodeling the splenic marginal zone during Leishmania donovani infection. *Am J Pathol*, 161(2), 429-437.
- Engwerda, C. R., Ato, M., & Kaye, P. M. (2004). Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol*, 20(11), 524-530. doi: 10.1016/j.pt.2004.08.009
- Engwerda, C. R., & Kaye, P. M. (2000). Organ-specific immune responses associated with infectious disease. *Immunol Today*, 21(2), 73-78.
- Engwerda, C. R., Murphy, M. L., Cotterell, S. E., Smelt, S. C., & Kaye, P. M. (1998). Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of Leishmania donovani. *Eur J Immunol*, 28(2), 669-680. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<669::AID-IMMU669&#62;3.0.CO;2-N

- Engwerda, C. R., Smelt, S. C., & Kaye, P. M. (1996). An in vivo analysis of cytokine production during Leishmania donovani infection in scid mice. *Exp Parasitol*, 84(2), 195-202. doi: 10.1006/expr.1996.0105
- Evans, D. A. (1993). In vitro cultivation and biological cloning of Leishmania. *Methods Mol Biol*, 21, 29-41. doi: 10.1385/0-89603-239-6:29
- Evans, T. G. (1993). Leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am, 7(3), 527-546.
- Fang, H. Y., Hughes, R., Murdoch, C., Coffelt, S. B., Biswas, S. K., Harris, A. L., . . . Lewis, C. E. (2009). Hypoxia-inducible factors 1 and 2 are important transcriptional effectors in primary macrophages experiencing hypoxia. *Blood*, *114*(4), 844-859. doi: 10.1182/blood-2008-12-195941
- Fangradt, M., Hahne, M., Gaber, T., Strehl, C., Rauch, R., Hoff, P., . . . Buttgereit, F. (2012). Human monocytes and macrophages differ in their mechanisms of adaptation to hypoxia. *Arthritis Res Ther*, 14(4), R181. doi: 10.1186/ar4011
- Faria, D. R., Souza, P. E., Duraes, F. V., Carvalho, E. M., Gollob, K. J., Machado, P. R., & Dutra, W. O. (2009). Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*, 31(8), 432-439. doi: 10.1111/j.1365-3024.2009.01125.x
- Frede, S., Stockmann, C., Freitag, P., & Fandrey, J. (2006). Bacterial lipopolysaccharide induces HIF-1 activation in human monocytes via p44/42 MAPK and NF-kappaB. *Biochem J*, 396(3), 517-527. doi: 10.1042/BJ20051839
- Gorak, P. M., Engwerda, C. R., & Kaye, P. M. (1998). Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following Leishmania donovani infection. *Eur J Immunol,* 28(2), 687-695. doi: 10.1002/(SICI)1521-4141(199802)28:02<687::AID-IMMU687&#62;3.0.CO;2-N
- Gramiccia, M., & Gradoni, L. (2005). The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol*, 35(11-12), 1169-1180. doi: 10.1016/j.ijpara.2005.07.001
- Grevelink, S. A., & Lerner, E. A. (1996). Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*, 34(2 Pt 1), 257-272.

- Guerin, P. J., Olliaro, P., Sundar, S., Boelaert, M., Croft, S. L., Desjeux, P., . . . Bryceson, A. D. (2002). Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. *Lancet Infect Dis*, 2(8), 494-501.
- Haddad, J. J. (2002). Recombinant human interleukin (IL)-1 beta-mediated regulation of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1 alpha) stabilization, nuclear translocation and activation requires an antioxidant/reactive oxygen species (ROS)-sensitive mechanism. *Eur Cytokine Netw*, 13(2), 250-260.
- Hammami, A., Charpentier, T., Smans, M., & Stager, S. (2015). IRF-5-Mediated Inflammation Limits CD8+ T Cell Expansion by Inducing HIF-1alpha and Impairing Dendritic Cell Functions during Leishmania Infection. *PLoS Pathog*, 11(6), e1004938. doi: 10.1371/journal.ppat.1004938
- Handman, E. (1999). Cell biology of Leishmania. Adv Parasitol, 44, 1-39.
- Hannah, S., Mecklenburgh, K., Rahman, I., Bellingan, G. J., Greening, A., Haslett, C., & Chilvers, E. R. (1995). Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro. *FEBS Lett*, 372(2-3), 233-237.
- Hasko, G., Linden, J., Cronstein, B., & Pacher, P. (2008). Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat Rev Drug Discov*, 7(9), 759-770. doi: 10.1038/nrd2638
- Holscher, C., Arendse, B., Schwegmann, A., Myburgh, E., & Brombacher, F. (2006). Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. *J Immunol*, 176(2), 1115-1121.
- Hu, C. J., Wang, L. Y., Chodosh, L. A., Keith, B., & Simon, M. C. (2003). Differential roles of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) and HIF-2alpha in hypoxic gene regulation. *Mol Cell Biol*, 23(24), 9361-9374.
- Hubbi, M. E., Hu, H., Kshitiz, Ahmed, I., Levchenko, A., & Semenza, G. L. (2013). Chaperonemediated autophagy targets hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) for lysosomal degradation. *J Biol Chem*, 288(15), 10703-10714. doi: 10.1074/jbc.M112.414771
- Hubbi, M. E., & Semenza, G. L. (2015). Regulation of cell proliferation by hypoxia-inducible factors. Am J Physiol Cell Physiol, 309(12), C775-782. doi: 10.1152/ajpcell.00279.2015
- Hurst, S. M., Wilkinson, T. S., McLoughlin, R. M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., . . . Jones, S. A. (2001). Il-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the

pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation. *Immunity*, 14(6), 705-714.

- Hwang, II, Watson, I. R., Der, S. D., & Ohh, M. (2006). Loss of VHL confers hypoxia-inducible factor (HIF)-dependent resistance to vesicular stomatitis virus: role of HIF in antiviral response. J Virol, 80(21), 10712-10723. doi: 10.1128/JVI.01014-06
- Imtiyaz, H. Z., Williams, E. P., Hickey, M. M., Patel, S. A., Durham, A. C., Yuan, L. J., . . . Simon, M. C. (2010). Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest*, 120(8), 2699-2714. doi: 10.1172/JCI39506
- Iniesta, V., Gomez-Nieto, L. C., & Corraliza, I. (2001). The inhibition of arginase by N(omega)hydroxy-1-arginine controls the growth of Leishmania inside macrophages. J Exp Med, 193(6), 777-784.
- Ip, W. K. E., Hoshi, N., Shouval, D. S., Snapper, S., & Medzhitov, R. (2017). Anti-inflammatory effect of IL-10 mediated by metabolic reprogramming of macrophages. *Science*, 356(6337), 513-519. doi: 10.1126/science.aal3535
- Ito, S., Ansari, P., Sakatsume, M., Dickensheets, H., Vazquez, N., Donnelly, R. P., . . . Finbloom,
  D. S. (1999). Interleukin-10 inhibits expression of both interferon alpha- and interferon gamma- induced genes by suppressing tyrosine phosphorylation of STAT1. *Blood*, 93(5), 1456-1463.
- Jacobson, R. L. (2003). Leishmania tropica (Kinetoplastida: Trypanosomatidae)--a perplexing parasite. *Folia Parasitol (Praha)*, *50*(4), 241-250.
- Jantsch, J., Chakravortty, D., Turza, N., Prechtel, A. T., Buchholz, B., Gerlach, R. G., . . . Willam, C. (2008). Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 alpha modulate lipopolysaccharide-induced dendritic cell activation and function. *J Immunol*, 180(7), 4697-4705.
- Joshi, T., Rodriguez, S., Perovic, V., Cockburn, I. A., & Stager, S. (2009). B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against Leishmania donovani infections. *PLoS Pathog*, 5(5), e1000431. doi: 10.1371/journal.ppat.1000431
- Jung, Y., Isaacs, J. S., Lee, S., Trepel, J., Liu, Z. G., & Neckers, L. (2003). Hypoxia-inducible factor induction by tumour necrosis factor in normoxic cells requires receptor-interacting

protein-dependent nuclear factor kappa B activation. *Biochem J*, 370(Pt 3), 1011-1017. doi: 10.1042/BJ20021279

- Kaelin, W. G., Jr., & Ratcliffe, P. J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol Cell*, *30*(4), 393-402. doi: 10.1016/j.molcel.2008.04.009
- Kamhawi, S. (2006). Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? *Trends Parasitol*, 22(9), 439-445. doi: 10.1016/j.pt.2006.06.012
- Kamhawi, S., Belkaid, Y., Modi, G., Rowton, E., & Sacks, D. (2000). Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. *Science*, 290(5495), 1351-1354.
- Katz, O., Waitumbi, J. N., Zer, R., & Warburg, A. (2000). Adenosine, AMP, and protein phosphatase activity in sandfly saliva. *Am J Trop Med Hyg*, 62(1), 145-150.
- Kaye, P., & Scott, P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*, 9(8), 604-615. doi: 10.1038/nrmicro2608
- Kaye, P. M., Svensson, M., Ato, M., Maroof, A., Polley, R., Stager, S., . . . Engwerda, C. R. (2004). The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev, 201*, 239-253. doi: 10.1111/j.0105-2896.2004.00188.x
- Kedzierski, L., & Evans, K. J. (2014). Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitology*, 1-19. doi: 10.1017/S003118201400095X
- Kedzierski, L., Sakthianandeswaren, A., Curtis, J. M., Andrews, P. C., Junk, P. C., & Kedzierska, K. (2009). Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Curr Med Chem*, 16(5), 599-614.
- Kilani, M. M., Mohammed, K. A., Nasreen, N., Tepper, R. S., & Antony, V. B. (2004). RSV causes HIF-1alpha stabilization via NO release in primary bronchial epithelial cells. *Inflammation*, 28(5), 245-251. doi: 10.1007/s10753-004-6047-y
- Killick-Kendrick, R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. *Med Vet Entomol*, 4(1), 1-24.
- Kohler, T., Reizis, B., Johnson, R. S., Weighardt, H., & Forster, I. (2012). Influence of hypoxiainducible factor 1alpha on dendritic cell differentiation and migration. *Eur J Immunol*, 42(5), 1226-1236. doi: 10.1002/eji.201142053
- Kojima, H., Gu, H., Nomura, S., Caldwell, C. C., Kobata, T., Carmeliet, P., ... Sitkovsky, M. V. (2002). Abnormal B lymphocyte development and autoimmunity in hypoxia-inducible

factor 1alpha -deficient chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(4), 2170-2174. doi: 10.1073/pnas.052706699

- Kondo, K., Klco, J., Nakamura, E., Lechpammer, M., & Kaelin, W. G., Jr. (2002). Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell*, 1(3), 237-246.
- Kung, A. L., Wang, S., Klco, J. M., Kaelin, W. G., & Livingston, D. M. (2000). Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat Med*, 6(12), 1335-1340. doi: 10.1038/82146
- Kurkjian, K. M., Mahmutovic, A. J., Kellar, K. L., Haque, R., Bern, C., & Secor, W. E. (2006).
   Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. *Cytometry A*, 69(5), 353-358. doi: 10.1002/cyto.a.20256
- Lainson, R., Shaw, J. J., & Silveira, F. T. (1987). Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 81(4), 702-703.
- Larbi, A., Zelba, H., Goldeck, D., & Pawelec, G. (2010). Induction of HIF-1alpha and the glycolytic pathway alters apoptotic and differentiation profiles of activated human T cells. *J Leukoc Biol*, 87(2), 265-273. doi: 10.1189/jlb.0509304
- Laskay, T., van Zandbergen, G., & Solbach, W. (2003). Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? *Trends Microbiol*, 11(5), 210-214.
- Laufs, H., Muller, K., Fleischer, J., Reiling, N., Jahnke, N., Jensenius, J. C., . . . Laskay, T. (2002). Intracellular survival of Leishmania major in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. *Infect Immun*, 70(2), 826-835.
- Lawless, S. J., Kedia-Mehta, N., Walls, J. F., McGarrigle, R., Convery, O., Sinclair, L. V., ... Finlay, D. K. (2017). Glucose represses dendritic cell-induced T cell responses. *Nat Commun*, 8, 15620. doi: 10.1038/ncomms15620
- Lee, K., Qian, D. Z., Rey, S., Wei, H., Liu, J. O., & Semenza, G. L. (2009). Anthracycline chemotherapy inhibits HIF-1 transcriptional activity and tumor-induced mobilization of circulating angiogenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(7), 2353-2358. doi: 10.1073/pnas.0812801106

- Liew, F. Y., Li, Y., & Millott, S. (1990). Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFNgamma in mediating killing of Leishmania major through the induction of nitric oxide. J Immunol, 145(12), 4306-4310.
- Lu, H., Samanta, D., Xiang, L., Zhang, H., Hu, H., Chen, I., . . . Semenza, G. L. (2015). Chemotherapy triggers HIF-1-dependent glutathione synthesis and copper chelation that induces the breast cancer stem cell phenotype. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(33), E4600-4609. doi: 10.1073/pnas.1513433112
- Machado-Coelho, G. L., Caiaffa, W. T., Genaro, O., Magalhaes, P. A., & Mayrink, W. (2005).
  Risk factors for mucosal manifestation of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R* Soc Trop Med Hyg, 99(1), 55-61. doi: 10.1016/j.trstmh.2003.08.001
- Mancino, A., Schioppa, T., Larghi, P., Pasqualini, F., Nebuloni, M., Chen, I. H., . . . Sica, A. (2008). Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions. *Blood*, *112*(9), 3723-3734. doi: 10.1182/blood-2008-02-142091
- Maroof, A., Beattie, L., Zubairi, S., Svensson, M., Stager, S., & Kaye, P. M. (2008). Posttranscriptional regulation of II10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity*, 29(2), 295-305. doi: 10.1016/j.immuni.2008.06.012
- Maspi, N., Abdoli, A., & Ghaffarifar, F. (2016). Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. *Pathog Glob Health*, 110(6), 247-260. doi: 10.1080/20477724.2016.1232042
- Matak, P., Heinis, M., Mathieu, J. R., Corriden, R., Cuvellier, S., Delga, S., . . . Peyssonnaux, C. (2015). Myeloid HIF-1 is protective in Helicobacter pylori-mediated gastritis. *J Immunol*, 194(7), 3259-3266. doi: 10.4049/jimmunol.1401260
- Mazzon, M., Castro, C., Roberts, L. D., Griffin, J. L., & Smith, G. L. (2015). A role for vaccinia virus protein C16 in reprogramming cellular energy metabolism. *J Gen Virol*, 96(Pt 2), 395-407. doi: 10.1099/vir.0.069591-0
- McElrath, M. J., Murray, H. W., & Cohn, Z. A. (1988). The dynamics of granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. *J Exp Med*, *167*(6), 1927-1937.
- McGovern, N. N., Cowburn, A. S., Porter, L., Walmsley, S. R., Summers, C., Thompson, A. A. R., . . . Chilvers, E. R. (2011). Hypoxia selectively inhibits respiratory burst activity and

killing of Staphylococcus aureus in human neutrophils. *J Immunol*, *186*(1), 453-463. doi: 10.4049/jimmunol.1002213

- Mebius, R. E., & Kraal, G. (2005). Structure and function of the spleen. *Nat Rev Immunol*, *5*(8), 606-616. doi: 10.1038/nri1669
- Menendez, M. T., Teygong, C., Wade, K., Florimond, C., & Blader, I. J. (2015). siRNA Screening Identifies the Host Hexokinase 2 (HK2) Gene as an Important Hypoxia-Inducible Transcription Factor 1 (HIF-1) Target Gene in Toxoplasma gondii-Infected Cells. *MBio*, 6(3), e00462. doi: 10.1128/mBio.00462-15
- Metheni, M., Echebli, N., Chaussepied, M., Ransy, C., Chereau, C., Jensen, K., . . . Langsley, G. (2014). The level of H(2)O(2) type oxidative stress regulates virulence of Theileria-transformed leukocytes. *Cell Microbiol*, *16*(2), 269-279. doi: 10.1111/cmi.12218
- Metheni, M., Lombes, A., Bouillaud, F., Batteux, F., & Langsley, G. (2015). HIF-1alpha induction, proliferation and glycolysis of Theileria-infected leukocytes. *Cell Microbiol*, 17(4), 467-472. doi: 10.1111/cmi.12421
- Miles, S. A., Conrad, S. M., Alves, R. G., Jeronimo, S. M., & Mosser, D. M. (2005). A role for IgG immune complexes during infection with the intracellular pathogen Leishmania. J Exp Med, 201(5), 747-754. doi: 10.1084/jem.20041470
- Mohebali, M., Hajjaran, H., Hamzavi, Y., Mobedi, I., Arshi, S., Zarei, Z., . . . Fakhar, M. (2005).
  Epidemiological aspects of canine visceral leishmaniosis in the Islamic Republic of Iran. *Vet Parasitol*, 129(3-4), 243-251. doi: 10.1016/j.vetpar.2005.01.010
- Moon, E. J., Jeong, C. H., Jeong, J. W., Kim, K. R., Yu, D. Y., Murakami, S., . . . Kim, K. W. (2004). Hepatitis B virus X protein induces angiogenesis by stabilizing hypoxia-inducible factor-1alpha. *FASEB J*, 18(2), 382-384. doi: 10.1096/fj.03-0153fje
- Moore, J. W., Moyo, D., Beattie, L., Andrews, P. S., Timmis, J., & Kaye, P. M. (2013). Functional complexity of the Leishmania granuloma and the potential of in silico modeling. *Front Immunol*, 4, 35. doi: 10.3389/fimmu.2013.00035
- Mosser, D. M., & Brittingham, A. (1997). Leishmania, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. *Parasitology*, 115 Suppl, S9-23.
- Mukbel, R. M., Patten, C., Jr., Gibson, K., Ghosh, M., Petersen, C., & Jones, D. E. (2007). Macrophage killing of Leishmania amazonensis amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. *Am J Trop Med Hyg*, 76(4), 669-675.

- Mukhopadhyay, D., Mukherjee, S., Roy, S., Dalton, J. E., Kundu, S., Sarkar, A., . . . Chatterjee,
  M. (2015). M2 Polarization of Monocytes-Macrophages Is a Hallmark of Indian Post
  Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(10), e0004145. doi: 10.1371/journal.pntd.0004145
- Muller, I., Kropf, P., Etges, R. J., & Louis, J. A. (1993). Gamma interferon response in secondary Leishmania major infection: role of CD8+ T cells. *Infect Immun*, 61(9), 3730-3738.
- Murphy, M. L., Wille, U., Villegas, E. N., Hunter, C. A., & Farrell, J. P. (2001). IL-10 mediates susceptibility to Leishmania donovani infection. *Eur J Immunol*, *31*(10), 2848-2856. doi: 10.1002/1521-4141(2001010)31:10<2848::AID-IMMU2848&#62;3.0.CO;2-T
- Murray, H. W. (1997). Endogenous interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, 175(6), 1477-1479.
- Murray, H. W. (2001). Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Exp Pathol*, 82(5), 249-267.
- Murray, H. W. (2008). Accelerated control of visceral Leishmania donovani infection in interleukin-6-deficient mice. *Infect Immun*, 76(9), 4088-4091. doi: 10.1128/IAI.00490-08
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies, C. R., & Saravia, N. G. (2005). Advances in leishmaniasis. *Lancet*, 366(9496), 1561-1577. doi: 10.1016/S0140-6736(05)67629-5
- Nakamura, H., Makino, Y., Okamoto, K., Poellinger, L., Ohnuma, K., Morimoto, C., & Tanaka,
   H. (2005). TCR engagement increases hypoxia-inducible factor-1 alpha protein synthesis via rapamycin-sensitive pathway under hypoxic conditions in human peripheral T cells. *J Immunol*, *174*(12), 7592-7599.
- Naldini, A., Morena, E., Pucci, A., Miglietta, D., Riboldi, E., Sozzani, S., & Carraro, F. (2012).
  Hypoxia affects dendritic cell survival: role of the hypoxia-inducible factor-1alpha and lipopolysaccharide. *J Cell Physiol*, 227(2), 587-595. doi: 10.1002/jcp.22761
- Nascimento, M. S., Carregaro, V., Lima-Junior, D. S., Costa, D. L., Ryffel, B., Duthie, M. S., . . . da Silva, J. S. (2015). Interleukin 17A acts synergistically with interferon gamma to promote protection against Leishmania infantum infection. *J Infect Dis*, 211(6), 1015-1026. doi: 10.1093/infdis/jiu531

- Ng, S., March, S., Galstian, A., Hanson, K., Carvalho, T., Mota, M. M., & Bhatia, S. N. (2014). Hypoxia promotes liver-stage malaria infection in primary human hepatocytes in vitro. *Dis Model Mech*, 7(2), 215-224. doi: 10.1242/dmm.013490
- Nizet, V., & Johnson, R. S. (2009). Interdependence of hypoxic and innate immune responses. *Nat Rev Immunol*, 9(9), 609-617. doi: 10.1038/nri2607
- Noman, M. Z., Desantis, G., Janji, B., Hasmim, M., Karray, S., Dessen, P., . . . Chouaib, S. (2014). PD-L1 is a novel direct target of HIF-1alpha, and its blockade under hypoxia enhanced MDSC-mediated T cell activation. J Exp Med, 211(5), 781-790. doi: 10.1084/jem.20131916
- Nowicki, S., & Gottlieb, E. (2015). Oncometabolites: tailoring our genes. *FEBS J*, 282(15), 2796-2805. doi: 10.1111/febs.13295
- Odashima, M., Bamias, G., Rivera-Nieves, J., Linden, J., Nast, C. C., Moskaluk, C. A., . . . Cominelli, F. (2005). Activation of A2A adenosine receptor attenuates intestinal inflammation in animal models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 129(1), 26-33.
- Ohteki, T., Fukao, T., Suzue, K., Maki, C., Ito, M., Nakamura, M., & Koyasu, S. (1999). Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. *J Exp Med*, 189(12), 1981-1986.
- Ouyang, W., Torigoe, C., Fang, H., Xie, T., & Frucht, D. M. (2014). Anthrax lethal toxin inhibits translation of hypoxia-inducible factor 1alpha and causes decreased tolerance to hypoxic stress. *J Biol Chem*, 289(7), 4180-4190. doi: 10.1074/jbc.M113.530006
- Owens, B. M., Beattie, L., Moore, J. W., Brown, N., Mann, J. L., Dalton, J. E., . . . Kaye, P. M. (2012). IL-10-producing Th1 cells and disease progression are regulated by distinct CD11c(+) cell populations during visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog*, 8(7), e1002827. doi: 10.1371/journal.ppat.1002827
- Papandreou, I., Cairns, R. A., Fontana, L., Lim, A. L., & Denko, N. C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab*, 3(3), 187-197. doi: 10.1016/j.cmet.2006.01.012
- Parks, S. K., Mazure, N. M., Counillon, L., & Pouyssegur, J. (2013). Hypoxia promotes tumor cell survival in acidic conditions by preserving ATP levels. *J Cell Physiol*, 228(9), 1854-1862. doi: 10.1002/jcp.24346

- Paun, A., Bankoti, R., Joshi, T., Pitha, P. M., & Stager, S. (2011). Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to Leishmania donovani infection. *PLoS Pathog*, 7(1), e1001246. doi: 10.1371/journal.ppat.1001246
- Pereira, W. F., Ribeiro-Gomes, F. L., Guillermo, L. V., Vellozo, N. S., Montalvao, F., Dosreis, G. A., & Lopes, M. F. (2011). Myeloid-derived suppressor cells help protective immunity to Leishmania major infection despite suppressed T cell responses. *J Leukoc Biol*, 90(6), 1191-1197. doi: 10.1189/jlb.1110608
- Peters, N. C., & Sacks, D. L. (2009). The impact of vector-mediated neutrophil recruitment on cutaneous leishmaniasis. *Cell Microbiol*, 11(9), 1290-1296. doi: 10.1111/j.1462-5822.2009.01348.x
- Peyssonnaux, C., Datta, V., Cramer, T., Doedens, A., Theodorakis, E. A., Gallo, R. L., . . . Johnson, R. S. (2005). HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. *J Clin Invest*, 115(7), 1806-1815. doi: 10.1172/JCI23865
- Phillips, R., Svensson, M., Aziz, N., Maroof, A., Brown, N., Beattie, L., . . . Kaye, P. M. (2010). Innate killing of Leishmania donovani by macrophages of the splenic marginal zone requires IRF-7. *PLoS Pathog*, 6(3), e1000813. doi: 10.1371/journal.ppat.1000813
- Pinto, M. C., Campbell-Lendrum, D. H., Lozovei, A. L., Teodoro, U., & Davies, C. R. (2001). Phlebotomine sandfly responses to carbon dioxide and human odour in the field. *Med Vet Entomol*, 15(2), 132-139.
- Polley, R., Stager, S., Prickett, S., Maroof, A., Zubairi, S., Smith, D. F., & Kaye, P. M. (2006).
  Adoptive immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis with CD8+ T cells requires the presence of cognate antigen. *Infect Immun*, 74(1), 773-776. doi: 10.1128/IAI.74.1.773-776.2006
- Randolph, G. J. (2001). Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin Immunol*, *13*(5), 267-274. doi: 10.1006/smim.2001.0322
- Reiner, S. L., & Locksley, R. M. (1995). The regulation of immunity to Leishmania major. Annu Rev Immunol, 13, 151-177. doi: 10.1146/annurev.iy.13.040195.001055
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, 7(9), 581-596. doi: 10.1016/S1473-3099(07)70209-8
- Resende, M., Moreira, D., Augusto, J., Cunha, J., Neves, B., Cruz, M. T., . . . Silvestre, R. (2013). Leishmania-infected MHC class IIhigh dendritic cells polarize CD4+ T cells toward a nonprotective T-bet+ IFN-gamma+ IL-10+ phenotype. *J Immunol*, 191(1), 262-273. doi: 10.4049/jimmunol.1203518
- Richer, M. J., Nolz, J. C., & Harty, J. T. (2013). Pathogen-specific inflammatory milieux tune the antigen sensitivity of CD8(+) T cells by enhancing T cell receptor signaling. *Immunity*, 38(1), 140-152. doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.017
- Ritter, U., Frischknecht, F., & van Zandbergen, G. (2009). Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites? *Trends Parasitol*, 25(11), 505-510. doi: 10.1016/j.pt.2009.08.003
- Rittig, M. G., & Bogdan, C. (2000). Leishmania-host-cell interaction: complexities and alternative views. *Parasitol Today*, *16*(7), 292-297.
- Rittig, M. G., Schroppel, K., Seack, K. H., Sander, U., N'Diaye, E. N., Maridonneau-Parini, I., . .
  Bogdan, C. (1998). Coiling phagocytosis of trypanosomatids and fungal cells. *Infect Immun*, 66(9), 4331-4339.
- Roberts, L. J., Handman, E., & Foote, S. J. (2000). Science, medicine, and the future: Leishmaniasis. *BMJ*, *321*(7264), 801-804.
- Rogers, M. E., Chance, M. L., & Bates, P. A. (2002). The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of Leishmania mexicana by the sandfly Lutzomyia longipalpis. *Parasitology*, 124(Pt 5), 495-507.
- Romano, A., Carneiro, M. B. H., Doria, N. A., Roma, E. H., Ribeiro-Gomes, F. L., Inbar, E., ... Peters, N. C. (2017). Divergent roles for Ly6C+CCR2+CX3CR1+ inflammatory monocytes during primary or secondary infection of the skin with the intra-phagosomal pathogen Leishmania major. *PLoS Pathog*, 13(6), e1006479. doi: 10.1371/journal.ppat.1006479
- Ronet, C., Hauyon-La Torre, Y., Revaz-Breton, M., Mastelic, B., Tacchini-Cottier, F., Louis, J., & Launois, P. (2010). Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with Leishmania major through IL-10 production. J Immunol, 184(2), 886-894. doi: 10.4049/jimmunol.0901114
- Ronet, C., Voigt, H., Himmelrich, H., Doucey, M. A., Hauyon-La Torre, Y., Revaz-Breton, M., .. Launois, P. (2008). Leishmania major-specific B cells are necessary for Th2 cell

development and susceptibility to L. major LV39 in BALB/c mice. J Immunol, 180(7), 4825-4835.

- Sacks, D. L., Lal, S. L., Shrivastava, S. N., Blackwell, J., & Neva, F. A. (1987). An analysis of T cell responsiveness in Indian kala-azar. *J Immunol*, 138(3), 908-913.
- Sacks, D. L., Scott, P. A., Asofsky, R., & Sher, F. A. (1984). Cutaneous leishmaniasis in anti-IgM-treated mice: enhanced resistance due to functional depletion of a B cell-dependent T cell involved in the suppressor pathway. *J Immunol*, 132(4), 2072-2077.
- Schietinger, A., & Greenberg, P. D. (2014). Tolerance and exhaustion: defining mechanisms of T cell dysfunction. *Trends Immunol*, 35(2), 51-60. doi: 10.1016/j.it.2013.10.001
- Scott, P. (1989). The role of TH1 and TH2 cells in experimental cutaneous leishmaniasis. *Exp Parasitol*, 68(3), 369-372.
- Semenza, G. L. (1999). Regulation of mammalian O2 homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 15, 551-578. doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.551
- Semenza, G. L. (2015). Regulation of the breast cancer stem cell phenotype by hypoxiainducible factors. *Clin Sci (Lond)*, *129*(12), 1037-1045. doi: 10.1042/CS20150451
- Semenza, G. L., & Wang, G. L. (1992). A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol*, 12(12), 5447-5454.
- Silva-Barrios, S., Smans, M., Duerr, C. U., Qureshi, S. T., Fritz, J. H., Descoteaux, A., & Stager,
  S. (2016). Innate Immune B Cell Activation by Leishmania donovani Exacerbates
  Disease and Mediates Hypergammaglobulinemia. *Cell Rep, 15*(11), 2427-2437. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.028
- Singh, A. K., Mukhopadhyay, C., Biswas, S., Singh, V. K., & Mukhopadhyay, C. K. (2012). Intracellular pathogen Leishmania donovani activates hypoxia inducible factor-1 by dual mechanism for survival advantage within macrophage. *PLoS One*, 7(6), e38489. doi: 10.1371/journal.pone.0038489
- Sitkovsky, M., & Lukashev, D. (2005). Regulation of immune cells by local-tissue oxygen tension: HIF1 alpha and adenosine receptors. *Nat Rev Immunol*, 5(9), 712-721. doi: 10.1038/nri1685
- Sitkovsky, M. V., Lukashev, D., Apasov, S., Kojima, H., Koshiba, M., Caldwell, C., . . . Thiel, M. (2004). Physiological control of immune response and inflammatory tissue damage by

hypoxia-inducible factors and adenosine A2A receptors. *Annu Rev Immunol*, 22, 657-682. doi: 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104731

- Spirig, R., Djafarzadeh, S., Regueira, T., Shaw, S. G., von Garnier, C., Takala, J., . . . Lepper, P. M. (2010). Effects of TLR agonists on the hypoxia-regulated transcription factor HIF-1alpha and dendritic cell maturation under normoxic conditions. *PLoS One*, 5(6), e0010983. doi: 10.1371/journal.pone.0010983
- Stager, S., Maroof, A., Zubairi, S., Sanos, S. L., Kopf, M., & Kaye, P. M. (2006). Distinct roles for IL-6 and IL-12p40 in mediating protection against Leishmania donovani and the expansion of IL-10+ CD4+ T cells. *Eur J Immunol*, 36(7), 1764-1771. doi: 10.1002/eji.200635937
- Stanley, A. C., Dalton, J. E., Rossotti, S. H., MacDonald, K. P., Zhou, Y., Rivera, F., . . . Engwerda, C. R. (2008). VCAM-1 and VLA-4 modulate dendritic cell IL-12p40 production in experimental visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog*, 4(9), e1000158. doi: 10.1371/journal.ppat.1000158
- Stanley, A. C., & Engwerda, C. R. (2007). Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol*, 85(2), 138-147. doi: 10.1038/sj.icb7100011
- Starska, K., Forma, E., Jozwiak, P., Brys, M., Lewy-Trenda, I., Brzezinska-Blaszczyk, E., & Krzeslak, A. (2015). Gene and protein expression of glucose transporter 1 and glucose transporter 3 in human laryngeal cancer-the relationship with regulatory hypoxiainducible factor-1alpha expression, tumor invasiveness, and patient prognosis. *Tumour Biol*, 36(4), 2309-2321. doi: 10.1007/s13277-014-2838-4
- Stelekati, E., Shin, H., Doering, T. A., Dolfi, D. V., Ziegler, C. G., Beiting, D. P., . . . Wherry, E. J. (2014). Bystander chronic infection negatively impacts development of CD8(+) T cell memory. *Immunity*, 40(5), 801-813. doi: 10.1016/j.immuni.2014.04.010
- Stober, C. B., Brode, S., White, J. K., Popoff, J. F., & Blackwell, J. M. (2007). Slc11a1, formerly Nramp1, is expressed in dendritic cells and influences major histocompatibility complex class II expression and antigen-presenting cell function. *Infect Immun*, 75(10), 5059-5067. doi: 10.1128/IAI.00153-07
- Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gurtler, R. E., McKerrow, J., . . . Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. J Clin Invest, 118(4), 1301-1310. doi: 10.1172/JCI33945

- Svensson, M., Maroof, A., Ato, M., & Kaye, P. M. (2004). Stromal cells direct local differentiation of regulatory dendritic cells. *Immunity*, 21(6), 805-816. doi: 10.1016/j.immuni.2004.10.012
- Svensson, M., Zubairi, S., Maroof, A., Kazi, F., Taniguchi, M., & Kaye, P. M. (2005). Invariant NKT cells are essential for the regulation of hepatic CXCL10 gene expression during Leishmania donovani infection. *Infect Immun*, 73(11), 7541-7547. doi: 10.1128/IAI.73.11.7541-7547.2005
- Takeda, N., O'Dea, E. L., Doedens, A., Kim, J. W., Weidemann, A., Stockmann, C., . . . Johnson,
  R. S. (2010). Differential activation and antagonistic function of HIF-{alpha} isoforms in macrophages are essential for NO homeostasis. *Genes Dev, 24*(5), 491-501. doi: 10.1101/gad.1881410
- Tomaskova, J., Oveckova, I., Labudova, M., Lukacikova, L., Laposova, K., Kopacek, J., . . . Pastorek, J. (2011). Hypoxia induces the gene expression and extracellular transmission of persistent lymphocytic choriomeningitis virus. J Virol, 85(24), 13069-13076. doi: 10.1128/JVI.00829-11
- Tomita, M., Semenza, G. L., Michiels, C., Matsuda, T., Uchihara, J. N., Okudaira, T., . . . Mori, N. (2007). Activation of hypoxia-inducible factor 1 in human T-cell leukaemia virus type 1-infected cell lines and primary adult T-cell leukaemia cells. *Biochem J*, 406(2), 317-323. doi: 10.1042/BJ20070286
- Trinchieri, G. (1998). Interleukin-12: a cytokine at the interface of inflammation and immunity. *Adv Immunol*, *70*, 83-243.
- Tsagozis, P., Karagouni, E., & Dotsika, E. (2005). Function of CD8+ T lymphocytes in a selfcuring mouse model of visceral leishmaniasis. *Parasitol Int*, 54(2), 139-146. doi: 10.1016/j.parint.2005.02.005
- Ullah, M. S., Davies, A. J., & Halestrap, A. P. (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem*, 281(14), 9030-9037. doi: 10.1074/jbc.M511397200
- Valanparambil, R. M., Tam, M., Jardim, A., Geary, T. G., & Stevenson, M. M. (2017). Primary Heligmosomoides polygyrus bakeri infection induces myeloid-derived suppressor cells that suppress CD4+ Th2 responses and promote chronic infection. *Mucosal Immunol*, 10(1), 238-249. doi: 10.1038/mi.2016.36

- Vassilaki, N., Kalliampakou, K. I., Kotta-Loizou, I., Befani, C., Liakos, P., Simos, G., . . . Mavromara, P. (2013). Low oxygen tension enhances hepatitis C virus replication. J Virol, 87(5), 2935-2948. doi: 10.1128/JVI.02534-12
- Venuprasad, K., Banerjee, P. P., Chattopadhyay, S., Sharma, S., Pal, S., Parab, P. B., . . . Saha, B. (2002). Human neutrophil-expressed CD28 interacts with macrophage B7 to induce phosphatidylinositol 3-kinase-dependent IFN-gamma secretion and restriction of Leishmania growth. *J Immunol*, 169(2), 920-928.
- Vidal, S., Tremblay, M. L., Govoni, G., Gauthier, S., Sebastiani, G., Malo, D., . . . Gros, P. (1995). The Ity/Lsh/Bcg locus: natural resistance to infection with intracellular parasites is abrogated by disruption of the Nramp1 gene. *J Exp Med*, 182(3), 655-666.
- Von Stebut, E. (2007). Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol*, 17(2), 115-122. doi: 10.1684/ejd.2007.0122
- von Stebut, E., Belkaid, Y., Jakob, T., Sacks, D. L., & Udey, M. C. (1998). Uptake of Leishmania major amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-Leishmania immunity. J Exp Med, 188(8), 1547-1552.
- Wakisaka, N., Kondo, S., Yoshizaki, T., Murono, S., Furukawa, M., & Pagano, J. S. (2004). Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 induces synthesis of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Mol Cell Biol*, 24(12), 5223-5234. doi: 10.1128/MCB.24.12.5223-5234.2004
- Walmsley, S. R., Cadwallader, K. A., & Chilvers, E. R. (2005). The role of HIF-1alpha in myeloid cell inflammation. *Trends Immunol*, 26(8), 434-439. doi: 10.1016/j.it.2005.06.007
- Wang, G. L., & Semenza, G. L. (1995). Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. J Biol Chem, 270(3), 1230-1237.
- Weigert, A., Weichand, B., Sekar, D., Sha, W., Hahn, C., Mora, J., . . . Brune, B. (2012). HIF-1alpha is a negative regulator of plasmacytoid DC development in vitro and in vivo. *Blood*, 120(15), 3001-3006. doi: 10.1182/blood-2012-03-417022
- Wenger, R. H., Stiehl, D. P., & Camenisch, G. (2005). Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE*, 2005(306), re12. doi: 10.1126/stke.3062005re12

Wherry, E. J. (2011). T cell exhaustion. *Nat Immunol*, 12(6), 492-499.

- WHO. 2000. The World Health Report 2000. Health systems: improving performance. In: World

   Health
   Organization
   G,
   editor.
   Available

   at:http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/
- WHO. 2017. The World Health Report 2017. Leishmaniose. In: World Health Organization G, editor. Available at:http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/fr/
- Wilson, D. C., Grotenbreg, G. M., Liu, K., Zhao, Y., Frickel, E. M., Gubbels, M. J., . . . Yap, G.
  S. (2010). Differential regulation of effector- and central-memory responses to Toxoplasma gondii Infection by IL-12 revealed by tracking of Tgd057-specific CD8+ T cells. *PLoS Pathog*, 6(3), e1000815. doi: 10.1371/journal.ppat.1000815
- Wobben, R., Husecken, Y., Lodewick, C., Gibbert, K., Fandrey, J., & Winning, S. (2013). Role of hypoxia inducible factor-1alpha for interferon synthesis in mouse dendritic cells. *Biol Chem*, 394(4), 495-505. doi: 10.1515/hsz-2012-0320
- Xiao, Z., Casey, K. A., Jameson, S. C., Curtsinger, J. M., & Mescher, M. F. (2009). Programming for CD8 T cell memory development requires IL-12 or type I IFN. J Immunol, 182(5), 2786-2794. doi: 10.4049/jimmunol.0803484
- Yang, M., Ma, C., Liu, S., Shao, Q., Gao, W., Song, B., . . . Qu, X. (2010). HIF-dependent induction of adenosine receptor A2b skews human dendritic cells to a Th2-stimulating phenotype under hypoxia. *Immunol Cell Biol*, 88(2), 165-171. doi: 10.1038/icb.2009.77
- Yang, M., Ma, C., Liu, S., Sun, J., Shao, Q., Gao, W., . . . Qu, X. (2009). Hypoxia skews dendritic cells to a T helper type 2-stimulating phenotype and promotes tumour cell migration by dendritic cell-derived osteopontin. *Immunology*, 128(1 Suppl), e237-249. doi: 10.1111/j.1365-2567.2008.02954.x
- Yang, Z. C., & Liu, Y. (2016). Hypoxia-Inducible Factor-1alpha and Autoimmune Lupus, Arthritis. *Inflammation*, 39(3), 1268-1273. doi: 10.1007/s10753-016-0337-z
- Yuan, G., Nanduri, J., Khan, S., Semenza, G. L., & Prabhakar, N. R. (2008). Induction of HIF-1alpha expression by intermittent hypoxia: involvement of NADPH oxidase, Ca2+ signaling, prolyl hydroxylases, and mTOR. J Cell Physiol, 217(3), 674-685. doi: 10.1002/jcp.21537

- Zelzer, E., Levy, Y., Kahana, C., Shilo, B. Z., Rubinstein, M., & Cohen, B. (1998). Insulin induces transcription of target genes through the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha/ARNT. *EMBO J*, 17(17), 5085-5094. doi: 10.1093/emboj/17.17.5085
- Zhou, J., Dehne, N., & Brune, B. (2009). Nitric oxide causes macrophage migration via the HIF-1-stimulated small GTPases Cdc42 and Rac1. *Free Radic Biol Med*, 47(6), 741-749. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2009.06.006
- Zhu, J., Yamane, H., & Paul, W. E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations
  (\*). Annu Rev Immunol, 28, 445-489. doi: 10.1146/annurev-immunol-030409-101212
- Zilberstein, D., & Shapira, M. (1994). The role of pH and temperature in the development of Leishmania parasites. Annu Rev Microbiol, 48, 449-470. doi: 10.1146/annurev.mi.48.100194.002313