Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique Institut Armand-Frappier

Rôle de la protéine HIF-1α dans les réponses immunitaires induites par les cellules myéloïdes lors de la leishmaniose viscérale expérimentale

Par

Mélina Smans

Mémoire ou thèse présentée pour l'obtention du grade de Maître ès sciences (M.Sc.) en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Pr Krista Heinonen Institut Armand-Frappier, Laval, Qc
Examinateur externe	Pr Sachiko Sato Département de microbiologie- infectiologie et immunologie Université Laval, Québec, Qc
Directeur de recherche	Pr Simona Stäger Institut Armand-Frappier, Laval, Qc

© Droits réservés de Mélina Smans, 2019

REMERCIEMENTS

Premièrement, j'aimerais remercier ma directrice de recherche, Dre Simona Stäger de m'avoir accueillie dans son laboratoire la toute première fois pour un stage d'été en 2012 et par la suite pour l'obtention de cette maîtrise.

Deuxièmement, un grand merci à la Fondation Armand-Frappier pour le financement qu'elle m'a accordé pour les sessions automne 2016 et hiver 2017.

Troisièmement, merci à mes collègues de laboratoire : Akil Hammami, Aymeric Fabié, Linh May Thuy et particulièrement, Sasha Silva pour tous ses conseils, son temps, sa patience et sa gentillesse, mais aussi pour toute l'organisation qu'elle donne au laboratoire. Ainsi que Tania Charpentier, pour son écoute et pour toute l'aide avec la gestion des souris.

Quatrièmement, je voudrais aussi remercier les membres de certains autres laboratoires, tels que Gabriel Ouellette, du laboratoire d'Angela Pearson pour son aide et son écoute patiente envers certaines difficultés encourues durant mes années de maîtrise. Ainsi que, Visnu Chaparro et Aude Zimmermann, du laboratoire de Pr Maritza Jaramillo, qui eux aussi m'ont donné de leur aide et temps précieux.

Cinquièmement, merci à Jessy Tremblay pour l'aide et les conseils offerts concernant la microscopie confocale et la cytométrie en flux.

Finalement, j'aimerais remercier ma famille et mes ami(e)s qui ont été à mes côtés durant cette période : mon père, pour m'avoir gâtée du mieux que tu pouvais et pour ton éternel humour. Yannis, mon frère, pour ton écoute, ta compréhension et tout ce qu'on a pu partager ensemble. Gwendal, pour ton amour et ton soutien dans la vie de tous les jours.

RÉSUMÉ

Lors de la leishmaniose viscérale expérimentale murine, le parasite intracellulaire Leishmania donovani cause une infection chronique dans la rate où il est possible d'observer une splénomégalie, une immunosuppression et un environnement chroniquement inflammé. Ce dernier est caractérisé par des niveaux d'oxygène bas et par la destruction des tissus, phénomènes qui induisent l'accumulation et la translocation au noyau du facteur de transcription HIF-1α dans toutes les cellules présentent. Le rôle de cette protéine dans les réponses immunitaires liées aux cellules myéloïdes dans le cadre de la leishmaniose expérimentale semble vaste et n'est pas encore très bien élucidé. Ici, nous utilisons un modèle d'ablation conditionnelle de HIF-1α dans les cellules myéloïdes à l'aide du système LysM-Cre et montrons que ce système n'est pas adéquat pour étudier les cellules myéloïdes de la rate. De plus, dans l'espoir d'améliorer les réponses immunitaires contre L. donovani en phase chronique, nous tentons de développer une thérapie chez la souris pour réduire la production de HIF-1α. La digoxine, glycoside cardiague fréquemment utilisé chez l'humain pour traiter l'insuffisance cardiaque, est utilisée car il a déjà été reporté qu'elle inhibe la synthèse de HIF-1α. Les résultats obtenus avec cette thérapie suggèrent qu'il n'est pas adéquat dans le cas de la leishmaniose viscérale. En effet, l'inhibition de HIF-1 α induite par la digoxine n'est pas assez spécifique pour être considéré comme un médicament potentiel.

Mots clés :

Cellules myéloïdes ; digoxine, HIF-1α ; *Leishmania donovani* ; leishmaniose viscérale ; *LysM-Cre*.

ABSTRACT

In murine experimental visceral leishmaniasis, the intracellular parasite Leishmania infection the donovani causes chronic in spleen where splenomegaly, immunosuppression and a chronically inflamed environment can be observed. The latter is characterized by low oxygen levels and tissue destruction, phenomena that induce the accumulation and translocation to the nucleus of the HIF-1 α transcription factor in all cells. The role of this protein in myeloid cell-related immune responses during experimental leishmaniasis appears to be extensive and not yet well understood. Here, we use a model of conditional knockdown of HIF-1α in myeloid cells using the *LysM-Cre* system and show that this system is not adequate for studying splenic myeloid cells. Moreover, in the hope of improving the immune responses against L. donovani during chronic phase, we try to develop a therapy to reduce the production of HIF-1a. Digoxin, a cardiac glycoside frequently used in humans to treat heart failure, is used because it has already been reported that it inhibits the synthesis of HIF-1 α . The results obtained with this therapy suggest that it is not adequate in the case of experimental visceral leishmaniasis. Indeed, the inhibition of HIF-1α induced by digoxin is not specific enough to be considered as a potential drug therapy.

Keywords :

Digoxin ; HIF-1α*; Leishmania donovani* ; *LysM-Cre* ; myeloid cells ; visceral leishmaniasis.

TABLE DES MATIÈRES

RE	MERCI	EMENTS	III		
RÉ	RÉSUMÉV				
AB	ABSTRACTVI				
ТА	TABLE DES MATIÈRESI)				
LIS	LISTE DES TABLEAUX				
LIS	LISTE DES FIGURESXI				
LIS	TE DE	S ABRÉVIATIONS	xv		
1			. 18		
2		REVUE DE LITTÉRATURE	20		
	2.1	Leishmaniose viscérale	20		
	2.2	Immunologie de la leishmaniose viscérale murine	23		
	2.3	Inflammation et hypoxie	33		
	2.4	Hypothèses de travail et objectifs	42		
3		MATÉRIEL ET MÉTHODE	45		
	3.1	Obtention d'un lignée de souris déficientes en HIF-1α dans les cellules myéloïdes	45		
	3.2	Utilisation de parasite Leishmania donovani	45		
	3.3	Utilisation de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDCs)	46		
	3.4	Récolte d'organes et suspensions cellulaires	47		
	3.5	Charge parasitaire	49		
	3.6	Cytométrie en flux	50		
	3.7	Isolation des cellules CD11b ⁺ de la rate	53		
	3.8	Immunobuvardage de type Western	54		
	3.9	PCR en temps réel	56		
	3.10	Microscopie confocale	57		
	3.11	Statistiques	58		
4		RÉSULTATS	59		
	4.1	Impacts de l'ablation conditionnelle de la protéine HIF-1 α des cellules myéloïdes lors de			
		la leishmaniose viscérale	59		
	4.2	Essaie d'une thérapie contre L. donovani	75		
5		DISCUSSION	89		

	5.1	Impacts de l'ablation conditionnelle de la protéine HIF-1 α des cellules myéloïdes lors de				
		la leishmaniose viscérale	89			
	5.2	Essaie d'une thérapie contre L. donovani	91			
6		CONCLUSION	. 95			
7		REFERENCES	. 97			
AN	ANNEXE I					
ANNEXE II						

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : mélanges d'anticorps utilisés pour l'analyse par cytométrie en flux des diverses sous-
populations de cellules myéloïdes retrouvées dans la rate des souris
Tableau II : mélanges d'anticorps utilisés pour l'analyse par cytométrie en flux des lymphocytes Th1 des
rates et des foies de souris
Tableau III : mélange d'anticorps utilisé pour le marquage des cryosections de rates de souris observées
par microscopie confocale

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : le cycle de vie des parasites d'espèce Leishmania	21
Figure 2 : illustration de la régulation de la sous-unité HIF-1α	35
Figure 3 : illustration des croisements pour la génération de souris dont un gène est supprimé via le	
système Cre-lox	60
Figure 4 : effets biologiques de l'infection par <i>L. donovani</i> sur la rate et le foie des souris $Hif1a^{flox/flox}$ et	
Hif1a ^{flox/flox} LysM-Cre ⁺	62
Figure 5 : l'absence de HIF-1 α dans les cellules myéloïdes n'affecte pas leur recrutement à la rate	65
Figure 6 : l'absence de HIF-1 $lpha$ dans les cellules myéloïdes n'engendre pas de différence dans la	
modification de la microarchitecture splénique	67
Figure 7 : comparaison des fréquences de cellules spléniques T CD4 ⁺ spécifiques aux antigènes de <i>L</i> .	
<i>donovani</i> chez les souris <i>Hif1a^{flox/flox}</i> et <i>Hif1a^{flox/flox} LysM-Cre</i> ⁺	69
Figure 8: comparaison des fréquences de cellules spléniques Tr1 chez les souris Hif1a ^{flox/flox} et Hif1a ^{flox/}	′flox
LysM-Cre ⁺	71
Figure 9 : comparaison des fréquences des cellules hépatiques T CD4 ⁺ spécifiques aux antigènes de <i>L</i>	
donovani chez les souris Hif1a ^{flox/flox} et Hif1a ^{flox/flox} LysM-Cre ⁺	73
Figure 10: le système <i>LysM-Cre</i> n'est pas efficace pour supprimer HIF-1α dans les cellules spléniques	
CD11b⁺ lors de l'infection par <i>L. donovani</i>	75
Figure 11 : effets biologiques d'une thérapie à la digoxine sur l'infection par <i>L. donovani</i>	77
Figure 12 : évaluation de la protéine HIF-1α et d'ARNm <i>Hif1a</i> dans les cellules spléniques des souris	
traitées ou non avec digoxine	79
Figure 13 : comparaison des fréquences des cellules T CD4 ⁺ spléniques spécifiques aux antigènes de	L.
donovani chez les souris traitées ou non avec digoxine	81
Figure 14 : comparaison des fréquences des cellules Tr1 spléniques chez les souris traitées ou non ave	ec
digoxine	83
Figure 15 : comparaison des fréquences des cellules T CD4 ⁺ hépatiques spécifiques aux antigènes de	L.
donovani chez les souris traitées ou non avec digoxine	85
Figure 16 : comparaison de la modification de la microarchitecture des rates des souris traitées ou non	
avec digoxine lors de l'infection par <i>L. donovani</i>	87

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- α:alpha
- β:beta
- **β-ME** : β-mercapthoéthanol
- γ:gamma
- °C: degré(s) Celsius
- **µg** : microgramme(s)
- **µL** : microlittre(s)
- **µm** : micron(s)

BMDCs : *Bone Marrow derived Dendritic Cell* ou cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse

- **CPA** : cellules présentatrices d'antigènes
- DCs : Dentritic Cells ou cellules dendritiques
- dd : double distillation

GM-CSF : *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* ou facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages

- FBS : Fetal Bovine Serum ou serum de fœtus bovin
- FITC : isothiocyanate de fluorescéine
- FMO : Fluorescence minus one ou contrôle de chevauchement spectral
- HIF : Hypoxia Inducible Factor ou facteur induit par l'hypoxie
- HPRT : Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
- HS : Horse Serum ou sérum de cheval
- IFN : interféron
- Ig: immunoglobuline
- IL : interleukine
- IMDM : Iscove's Modified Dulbecco's Medium

- iNOS : inducible Nitric Oxyde Synthase
- ip: intrapéritonéale
- iv : intraveineuse
- **jpi**: jour(s) post-infection
- LV : leishmaniose viscérale
- **LDA**: Limiting Dilution Assay
- LDU : Leishman-Donovan Units
- MACS : Magnetic-Activated Cell Sorting ou séparation cellulaire par billes magnétiques
- MFI : Mean Fluorescent Intensity ou moyenne de l'intensité de fluorescence
- mg: milligramme
- **mM** : millimolaire
- mL : millilittre
- ng : nanogramme
- ns : non significatif
- OMS : organisation mondiale de la santé
- PALS : Periarteriolar Lymphoid Sheaths ou manchon périartériolaire lymphoïde
- PBS : Phosphate Buffered Saline ou tampon phosphate
- PCR : Polymerase Chain Reaction
- PE : phycoérythrine
- **pi**: post-infection
- PSG : pénicilline-streptomycine-glutamine
- p/v: poids/volume
- rpm : rotations par minute
- RAG^{-/-} : souris déficiente en lymphocyte mature
- **RPMI :** Roswell Park Memorial Institute medium
- ROS : Reactive Oxygen Species ou éléments réactifs d'oxygène

- TCR : T Cell Receptor ou récepteur de cellule T
- Th1 : lymphocytes T auxiliaires de type 1
- **Th2** : lymphocytes T auxiliaires de type 2
- Th17 : lymphocytes T auxiliaires de type 17
- TNF : Tumor Necrosis Factor ou facteur de nécrose tumorale
- TLR : Toll-Like Receptor ou récepteur de type Toll
- Tr1 : lymphocytes T régulatoires de type 1
- **v/v**: volume/volume
- WT : phénotype sauvage

1 INTRODUCTION

Les leishmanioses sont des maladies causées par des parasites intracellulaires de genre *Leishmania spp.* et qui se retrouvent dans 98 pays du monde. Elles sont transmises et disséminées par la morsure d'une mouche femelle phlébotome et 3 formes de leishmaniose peuvent en résulter selon l'espèce inoculée : cutanée, muco-cutanée et viscérale. Ces maladies sont un important problème de la santé publique mondiale, car chaque année il y a entre 700 000 et 1 million de nouveaux cas et 20 000 à 30 000 décès associées aux leishmanioses (World Health Organisation, 2017). Étrangement, les individus infectés par ce type de parasite ne développent pas tous une leishmaniose. En effet, certains individus peuvent être asymptomatiques alors que d'autres deviennent malades. Comme ces maladies ont un impact considérable sur la santé publique mondiale, il est important de comprendre pourquoi dans certains cas le système immunitaire est incapable de fonctionner adéquatement, et de faire ressortir les mécanismes immunitaires qui mènent au développement de la maladie ou au contrôle de l'infection (Kumar & Nylen, 2012).

Notre laboratoire travaille avec le parasite *Leishmania donovani* qui cause la leishmaniose viscérale (LV). Cette maladie, qui est caractérisée par des fièvres irrégulières, une hypergammaglobulinémie, une hépatosplénomégalie et une immunodéficience progressive, a pour modèle expérimental la souris. L'inflammation et la destruction des tissus associées à cette maladie sont des événements stressants pour les cellules. Afin de survivre à ces conditions difficiles et de protéger les tissus, les cellules du système immunitaire enclenchent l'accumulation du facteur de transcription HIF-1α. La transcription des gènes associés provoque des effets divers allant de l'immunosuppression à la migration des cellules myéloïdes au site d'inflammation.

Grâce aux résultats obtenus dans notre laboratoire et par d'autres, on sait que HIF-1α dirige la spécialisation cellulaire en macrophages associés aux tumeurs (TAM) ou encore en cellules myéloïdes suppressives (MDSC) (Hammami *et al.*, 2017; Hammami *et al.*, 2015; Palazon *et al.*, 2014; Werno *et al.*, 2010). De plus, l'accumulation de la protéine dans les cellules dendritiques altère leurs fonctions au détriment de la réponse cellulaire T CD8⁺ contre le parasite (Hammami *et al.*, 2015). Ainsi, puisque les cellules myéloïdes

(neutrophiles, cellules dendritiques, monocytes et macrophages) sont la première ligne de défense contre les microorganismes envahissant, que *L. donovani* a un tropisme pour les macrophages et qu'en cas de persistance d'une infection, les cellules myéloïdes activent les cellules de la réponse immunitaire adaptative, il est important d'enquêter sur les effets possibles de l'expression de la protéine HIF-1 α chez les cellules myéloïdes. Cette expression est-elle un avantage ou un désavantage pour les réponses cellulaires contre le parasite?

Ce mémoire de maîtrise s'oriente autour de cette question et est organisé comme il suit: d'abord, une revue de littérature qui regroupe les informations connues à propos de la leishmaniose viscérale, de l'immunologie lors de la LV expérimentale murine, de l'inflammation et l'hypoxie. C'est dans cette section qu'il y a les hypothèses et les objectifs de ce projet de maîtrise. Par la suite, une section est dédiée à la méthodologie utilisée. Puis, dans la section suivante, les résultats obtenus sont exposés en deux parties. La première partie porte sur l'impact de l'ablation conditionnelle de la protéine HIF-1 α des cellules myéloïdes lors de la LV et la deuxième partie porte sur l'essaie d'une thérapie contre *L. donovani*. Finalement, une discussion et une conclusion sur l'ensemble du projet terminent ce mémoire. Bonne lecture !

2 REVUE DE LITTÉRATURE

2.1 Leishmaniose viscérale

La leishmaniose viscérale est une infection qui affecte les viscères, dont le foie et la rate, et qui est issue d'une infection par des parasites protozoaires flagellés du genre *Leishmania*, famille *Trypanosomatidae*. Il y a trois espèces répertoriées qui sont responsables de la maladie : *Leishmania donovani* et *Leishmania infantum/chagasi*. Leur mode de transmission principal est par la piqûre d'un phlébotome femelle, petit moucheron, qui se nourrit aussi bien sur les êtres humains que sur les animaux (Carré *et al.*, 2010). Cette maladie est présente dans 69 pays et son incidence mondiale est estimée par l'OMS à 50 000 à 90 000 cas/an (World Health Organisation, 2017).

2.1.1 Parasite et cycle de vie

Les parasites d'espèce *Leishmania* partagent leur cycle de vie entre 2 types d'hôtes : le mammifère (humains, chiens, rongeurs, etc.) et l'insecte vecteur, le phlébotome (Figure 1). Le phlébotome porte dans son système digestif des parasites sous la forme de promastigote. Ceux-ci sont inoculés dans le mammifère et envahissent les phagocytes mononucléés (macrophages, neutrophiles, granulocytes et cellules dendritiques) par liaison et phagocytose. Ils se transforment alors en amastigotes (2) et se répliquent dans le phagolysosome de la cellule (3). La lyse d'une cellule infectée permet par la suite l'invasion d'autres cellules de l'hôte (4). C'est lorsque l'insecte pique l'hôte mammifère pour se nourrir qu'il s'infecte à son tour avec des amastigotes (libres ou présents dans des cellules du sang) (5). Une fois à l'intérieur du phlébotome, les parasites se différencient (6) et se transforment en promastigotes (7) pour compléter le cycle (Müller & Kropf, 2012).



Figure 1 : le cycle de vie des parasites d'espèce Leishmania

Les promastigotes Leishmania sont inoculés par un phlébotome (1) dans l'hôte vertébré. Ils s'attachent aux phagocytes et se font phagocyter, puis se transforment en amastigotes (2). Ils se répliquent dans le phagolysosome de la cellule (3). L'invasion d'autres cellules se fait lorsqu'une cellule infectée se lyse (4). C'est lorsque l'insecte pique l'hôte vertébré pour se nourrir qu'il s'infecte à son tour avec des amastigotes (libres ou présents dans des cellules du sang) (5). Une fois à l'intérieur du phlébotome, les parasites se différencient (6) et se transforment en promastigotes (7) pour compléter le cycle.

2.1.2 Aspects cliniques

Chez l'humain, certains peuvent être infectés, mais demeurer asymptomatiques et donc ne développent pas la maladie. Ce sont généralement des individus aux défenses immunitaires affaiblis qui développent la LV (Carré *et al.*, 2010). Après la transmission des parasites par la morsure d'un Phlébotome, ceux-ci se déplacent par la voie sanguine et infectent les cellules phagocytaires (macrophages, cellules dendritiques, etc.). C'est à l'intérieur de ces cellules que survivent et se multiplient les *Leishmania*. Après une période d'incubation qui peut durer entre 2 et 4 mois, la LV se manifeste par des fièvres irrégulières, une perte de poids importante, un grossissement de la rate (splénomégalie) et parfois du foie (hépatosplénomégalie), ainsi qu'une anémie due à la demande importante de cellules immunitaires au détriment des globules rouges. La maladie amène progressivement l'individu infecté dans un état d'immunosuppression qui le rend vulnérable à des infections opportunistes. Dans les régions endémiques, on voit beaucoup de co-infections avec la tuberculose et c'est généralement à cause de ces co-infections opportunistes que près de 100% des malades non traités meurent de la LV (Carré *et al.*, 2010).

2.1.3 Préventions et traitements contre la LV

Heureusement, la plupart des cas de LV peuvent être traités, car plusieurs médicaments existent. Comme traitement conventionnel on utilise l'injection intraveineuse d'antimoine pentavalent (ou de molécules dérivées), mais suite à de nombreuses résistances en Inde et en Europe, d'autres médicaments ont été développés. De nos jours, on traite davantage avec la Miltéfosine, traitement oral d'environ 28 jours, ou avec l'Amphotéricine B sous forme de liposome comme traitement court (Faucher & Piarroux, 2011). Cependant, ces traitements sont fortement toxiques. De plus, la plupart des cas nécessitent une hospitalisation, ce qui engendre de hauts coûts au traitement.

Malgré 70 ans de traitements anti-*Leishmania* et autant d'années en recherche, aucune prophylaxie (c.-à-d. vaccin approuvé) n'existe encore. Les seuls moyens pour éviter l'inoculation à l'être humain restent encore le contrôle des vecteurs (pesticides et gestion des réservoirs animaux) et l'utilisation de moustiquaires à mailles très fines et induites d'insecticide (Faure, 2017). Ainsi, il existe un besoin urgent pour le développement de vaccins et de traitements peu coûteux et moins toxiques (Kumar & Nylen, 2012).

2.2 Immunologie de la leishmaniose viscérale murine

Puisqu'il est difficile d'étudier les organes et les réponses immunitaires des patients atteints de LV sans faire de procédures trop invasives, les scientifiques travaillent en laboratoire avec des souches de souris qui développent aussi la maladie. Après inoculation, les parasites tels que *L. donovani* vont s'installer principalement dans les macrophages et vont détourner plusieurs composantes cellulaires afin de proliférer (Moradin & Descoteaux, 2012; Olivier *et al.*, 2012; Podinovskaia & Descoteaux, 2015; Shio *et al.*, 2012). Cependant, cette prolifération finit par activer l'immunité innée, puis avec le temps l'immunité acquise. Une réponse immunitaire efficace contre la LV est principalement due à une production d'IFNy par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, ainsi que par l'activation des macrophages capables alors d'éliminer les parasites à l'aide de radicaux libres et d'oxyde d'azote (NO) (Bankoti & Stäger, 2012; Faucher & Piarroux, 2011).

Chez la souris, une immunité compartimentalisée est observée durant l'infection, c'est-àdire que les réponses immunitaires sont différentes selon l'organe touché. En effet, dans le foie, il faut entre 6 à 8 semaines pour que les parasites soient contrôlés. Tandis que dans la rate, les réponses immunitaires ne permettent pas l'élimination complète des parasites et l'infection est persistante (Bankoti & Stäger, 2012).

2.2.1 Réponse immunitaire dans le foie

Le foie, centre de synthèse métabolique, de stockage et de détoxification est aussi le siège de mécanismes immunitaires complexes. Cet organe, composé à 60% d'hépatocytes, contient cependant un large nombre de cellules immunitaires lymphoïdes (cellules NK [tueuses naturelles], NKT [T tueuses naturelles] et T) et myéloïdes (cellules dendritiques (DCs) et macrophages) (Lapierre & Alvarez, 2007).

Les cellules de Kupffer, macrophages résidents du foie, orchestrent lors d'une infection les premières phases de la réponse immune via la sécrétion de cytokines qui agissent,

entre autres, sur les cellules NK et les DCs (Lapierre & Alvarez, 2007). Cependant, les cellules de Kupffer ont une faible immunité innée contre *L. donovani*, ce qui fait qu'il y a, durant les premières semaines post-infection, multiplication graduelle avant d'y avoir un contrôle du parasite. Comme mentionné au début de la section 2.2, la leishmaniose expérimentale au niveau du foie est contrôlée après quelques semaines d'infection. Ce contrôle est dû à la formation de granulomes inflammatoires à réponses immunitaires de type Th1 produisant beaucoup d'IFNγ (Stäger *et al.*, 2010). Ces granulomes sont des amas de cellules infiltrées (monocytes, neutrophiles et cellules T) qui se forment autour de cellules de Kupffer infectés. Ces organisations cellulaires permettent de limiter l'expansion de l'infection, la concentration des cellules effectrices et des médiateurs solubles (cytokines inflammatoires, facteurs de croissance) et par la suite, la réparation des tissus (Gangneux *et al.*, 2006).

L'activation du système immunitaire engendrée par la présence des parasites induit la production de signaux moléculaires qui permettent le recrutement cellulaire au foie. Chaque type cellulaire recruté sur place a son importance dans la réponse immunitaire associée. Les DCs activées produisent de l'IL-12 qui est essentielle dans la maturation des granulomes et qui induit la production d'IFNy par les cellules T CD4⁺ présents (Gorak et al., 1998; Murray, 1997; Scharton-Kersten et al., 1995). Ces dernières activent les macrophages par l'IFNy, augmentent leur production de TNF et induisent l'expression de l'oxyde nitrique synthase (iNOS) qui sont respectivement nécessaires à la maturation des granulomes et à l'élimination des parasites (Bankoti & Stäger, 2012; Kaye et al., 2004). De plus, la production d'IFNy et l'activation des cellules T CD4⁺ promeuvent aussi la participation des T CD8⁺ (Maltezou, 2008). Ceux-ci jouent aussi un rôle dans la formation du granulome et sont importants pour la résistance lors de nouvelles expositions (Murray et al., 1992). Après 2 à 4 semaines post-infection, les granulomes inflammatoires sont complètement matures et le nombre de parasites présent diminue jusqu'à 8 semaines post-infection (pi). Cependant, malgré une réponse immunitaire efficace, il n'y a jamais élimination complète de L. donovani dans le foie et il est pensé que cette présence parasitaire résiduelle est ce qui maintient la réponse immunitaire à long terme dans le foie (Rodrigues et al., 2016; Stanley & Engwerda, 2007).

2.2.2 Réponse immunitaire dans la rate

La rate, organe lymphoïde secondaire, est organisée en 3 régions ; il y a 1) la pulpe rouge, 2) la pulpe blanche et entre les deux, 3) la zone marginale. La pulpe rouge est chargée de filtrer le sang des globules rouges déficients. Les macrophages présents dans la pulpe rouge permettent, par la phagocytose, le recyclage du fer présents dans les globules rouges. La zone marginale est elle aussi constituée de macrophages et de cellules dendritiques. Ces cellules stationnées dans cette région de la rate sont chargées de surveiller le sang pour les antigènes des agents pathogènes. La pulpe blanche, quant à elle, est constituée de cellules T et B. C'est l'endroit où les réponses immunitaires spécifiques à un antigène sont générées lorsqu'il y a présentation antigénique par les cellules de la zone marginale (Bronte & Pittet).

Comme mentionné au début de la section 2.2, la leishmaniose expérimentale murine au niveau de la rate n'est pas complètement contrôlée par le système immunitaire. Ainsi, l'infection peut être distinguée en deux phases : la phase aigüe et la phase chronique.

Phase aigüe

La phase aigüe se déroule durant les premiers jours de l'infection, soit de 0 à 14 jours post-infection (pi). Initialement, environ 95% des parasites circulant dans le sang sont phagocytés par 3 populations distinctes de macrophages spléniques ; les macrophages de la pulpe rouge (RpMΦ), les macrophages de la zone marginale (MZMΦ) et les macrophages métallophiliques (MMΦ) (Gorak *et al.*, 1998). Ces macrophages, au contraire des cellules de Kupffer, sont très efficaces pour tuer les parasites (Engwerda *et al.*, 2004a; Rodrigues *et al.*, 2016; Stanley & Engwerda, 2007; Svensson *et al.*, 2005). La présence de ces parasites active une forte réponse proinflammatoire caractérisée par la production de cytokines clés telles que TNF, IFNγ et IL-12. Cette dernière peut être détectée aussi tôt que 5 heures après l'infection et est majoritairement produite par les DCs CD8⁺ spléniques (Maroof & Kaye, 2008; Stäger *et al.*, 2010). Ainsi, les DCs matures

font la présentation antigénique aux cellules de la pulpe blanche à peine quelques heures après l'infection et produisent de l'IL-12. L'accumulation de cette cytokine engendre les réponses protectrices T CD4⁺, mais probablement aussi T CD8⁺ par présentation croisée (Rodrigues *et al.*, 2016; Stanley & Engwerda, 2007). Les cellules T CD8⁺ sont aussi très importantes dans l'élimination des parasites. Cependant, *L. donovani* engendre des réponses T CD8⁺ défectueuses par l'intermédiaire de l'inflammation qui empêche le bon fonctionnement des DCs (Hammami *et al.*, 2015; Joshi *et al.*, 2009).

La population T CD4⁺ de type Th1 spécifiques aux parasites est détectable durant les premiers jours de l'infection et augmente petit à petit pendant les premières semaines (Rodrigues *et al.*, 2016; Stanley & Engwerda, 2007). Leur production d'IFN γ est primordiale pour l'activation des macrophages et l'élimination des parasites (Squires *et al.*, 1989; Stanley & Engwerda, 2007; Taylor & Murray, 1997). En plus de l'IL-12, les DCs produisent aussi de l'IL-23, ce qui induit la différenciation des cellules T CD4⁺ en Th17. Ces derniers semblent aussi être importants pour une réponse protectrice durant la LV, car l'IL-17A qu'ils produisent agit en synergie avec l'IFN γ pour activer la production de NO par les macrophages infectés (Nascimento *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2016). Finalement, il est probable que les cellules NK, NKT et possiblement T $\gamma\delta$ soient impliquées dans la production précoce des cytokines proinflammatoires permettant le développement de l'immunité dans la rate. Cependant, leurs rôles précis restent encore inconnus (Stanley & Engwerda, 2007).

Après la période initiale d'élimination des parasites par les macrophages spléniques, la charge parasitaire se maintient de façon constante pendant les deux premières semaines de l'infection. C'est après la troisième semaine qu'il y a augmentation progressive du nombre de parasites, marquant ainsi le début de la phase chronique (Engwerda *et al.*, 2004a; Rodrigues *et al.*, 2016).

Phase chronique

La persistance du parasite dans la rate est associée à une splénomégalie importante. En effet, l'infection engendre une infiltration massive de cellules myéloïdes à la rate et une

hypertrophie de la pulpe rouge (Hammami et al., 2017). Parmi ces cellules myéloïdes, la majorité des monocytes qui expriment de hauts niveaux de Ly6C sont positifs pour les molécules MHC-II et Sca-1, suggérant un phénotype immunorégulateur (Abidin et al., 2017 ; Askenase et al. ; Hammami et al., 2017). En effet, notre laboratoire a publié que ces cellules ont la capacité d'inhiber la différenciation des cellules T en Th1 (Hammami et al., 2018 ; Hammami et al., 2017). Ainsi, les cellules myéloïdes spléniques durant la LV, sont phénotypiquement et fonctionnellement similaires à des cellules myéloïdes suppressives (MDSC) et représentent fort probablement un mécanisme d'échappement utilisé par L. donovani. De plus, la persistance du parasite dans la rate est aussi associée à la destruction de la microarchitecture splénique (Engwerda et al., 2004b). En effet, l'infection engendre une forte concentration de TNF. Cette cytokine, majoritairement produite par les macrophages, est essentielle au développement des réponses immunitaires dans le foie, mais est nuisible aux réponses immunitaires dans la rate lorsque présente en trop grande quantité (Murray et al., 2000). Effectivement, elle induit l'apoptose des cellules de la zone marginale et des cellules T présentent dans la pulpe blanche (Carrion et al., 2006; Engwerda et al., 2002; Stanley & Engwerda, 2007). La zone marginale splénique, spécialisée dans la régulation de la nidification des lymphocytes dans le manchon périartériolaire lymphoïde (PALS), est le site d'initiation des réponses adaptatives (Gorak et al., 1998; Kraal, 1992; Mebius & Kraal, 2005). Ainsi, la perte de la zone marginale prévient la bonne migration des DCs et des cellules T naïves, ce qui contribue à l'altération des réponses adaptatives observées lors de la LV (Smelt et al., 1997; Stanley & Engwerda, 2007).

La phase chronique est aussi associée au développement d'une population de cellules T CD4⁺ co-productrices d'IFN γ et d'IL-10 (Stäger *et al.*, 2006). Ces cellules, aussi appelées lymphocytes T régulateurs de type 1 (Tr1), sont probablement un mécanisme d'autocontrôle qui permet de limiter les dommages collatéraux à une inflammation trop intense (Trinchieri, 2007). Cependant, ce mécanisme peut aussi être utilisé par *L. donovani* comme moyen d'échappement (Trinchieri, 2007). En effet, l'IL-10 probablement induit par la forte concentration de TNF (Ato *et al.*, 2002), promeut la persistance du parasite (Murray *et al.*, 2002). Les souris *IL10^{-/-}* sont hautement résistantes à *L. donovani*

(Murray *et al.*, 2002) et l'inhibition du récepteur à l'IL-10 durant la LV augmente la production d'IFN γ et l'expression d'iNOS (Murray *et al.*, 2003). Au même moment durant l'infection, il est possible d'observer un épuisement des cellules T CD8⁺ spécifiques. En effet, l'expression des récepteurs inhibiteurs PD-1 et LAG-3 est augmentée chez les lymphocyte T CD8⁺ spécifiques, ce qui résulte en des cellules aux fonctions effectrices très limitées (Bankoti & Stäger, 2012). Ainsi, le microenvironnement inflammatoire splénique joue un rôle très important dans le modelage des réponses anti-*Leishmania* et nécessite d'être investigué davantage. D'ailleurs, certains travaux, incluant ceux de notre laboratoire, ont permis d'identifier HIF-1 α comme acteur clé dans ce microenvironnement (voir section 2.3 pour la littérature associée).

2.2.3 Le rôle des cellules myéloïdes impliquées dans la leishmaniose viscérale expérimentale murine

Avec la littérature scientifique précédemment mentionnée, on sait déjà que les cellules comme les monocytes, macrophages et DCs, sont des éléments importants durant la LV. Ces cellules qui font partie de la catégorie des cellules myéloïdes sont nécessaires dans la communication entre le système immunitaire inné et adaptatif. En effet, parmi elles, certaines font la présentation antigénique et permettent le recrutement des cellules du système immunitaire adaptatif au site d'infection. Cependant, il semble que ces cellules ne jouent pas que des rôles bénéfiques durant la LV. Ainsi, la section ci-dessous rassemble la littérature scientifique sur les différents rôles que peuvent jouer les cellules myéloïdes pendant la LV et essaie de souligner l'importance d'investigations plus approfondies.

Neutrophiles

Les neutrophiles, cellules essentielles dans la réponse inflammatoire, contribuent à la phagocytose et à l'élimination de divers agents pathogènes. Cependant, leur rôle spécifique dans la réponse immunitaire contre la LV n'est pas encore très clair. Il semble

qu'ils contribuent au développement de la réponse immunitaire protectrice contre *L. donovani,* car en effet, l'utilisation d'anticorps anti-neutrophile (RB6-8C5) lors de la première semaine d'infection est associée à une plus grande susceptibilité de la souris envers le parasite (McFarlane *et al.*, 2008). Dans la rate, cette équipe de recherche a observé que sans neutrophile, la charge parasitaire est plus élevée, il y a augmentation des niveaux des cytokines IL-4 et IL-10, et diminution d'IFNγ sécrété par les cellules T CD4⁺ et CD8⁺. Dans le foie, les chercheurs ont observé un retard dans la maturation des granulomes inflammatoires ainsi qu'une diminution de l'expression cellulaire d'iNOS (McFarlane *et al.*, 2008). Cependant, l'utilisation RB6-8C5 comme anticorps antineutrophiles n'est plus acceptée (Ribeiro-Gomes & Sacks, 2012) puisque celui-ci cible d'autres cellules myéloïdes (Geissmann *et al.*, 2003; Matsuzaki *et al.*, 2003; Nakano *etal.*, 2001; Tepper *et al.*, 1992). Ainsi, davantage d'investigations sur le rôle des neutrophiles durant la LV sont nécessaires.

Monocytes

Les monocytes sont des cellules phagocytaires mobiles qui patrouillent la paroi vasculaire. Ils ont la capacité d'acquérir des morphologies différentes tout en gardant comme principale fonction la phagocytose. En effet, en cas d'inflammation ou d'infection, ils peuvent quitter le sang périphérique pour s'infiltrer dans les différents tissus de l'organisme et se différencier en macrophages ou en cellules dendritiques (Auffray *et al.*, 2009). Les monocytes peuvent être divisés en deux sous-familles : les monocytes patrouilleurs et les monocytes inflammatoires (iMOs) (Geissmann *et al.*, 2003). La première permet de maintenir dans les tissus les populations de macrophages/DCs, alors que la deuxième, infiltrent en masse les tissus en cas d'inflammation afin de participer à l'élimination des pathogènes et au contrôle des dommages tissulaires (Liu *et al.*, 2017; Serbina *et al.*, 2008).

Il n'y a pas beaucoup de littérature scientifique sur le rôle des monocytes durant la LV. Cependant, nous avons publié, ainsi que d'autres chercheurs, qu'il y a un recrutement important d'iMOs (CD11b⁺ Ly6C^{hi}) au foie et à la rate (Abidin *et al.*, 2017; Hammami *et*

al., 2017). Au foie, les iMOs contribuent à la formation des granulomes, alors que dans la rate ils semblent jouer un autre rôle (Hammami *et al.*, 2017; Terrazas *et al.*, 2017). En effet, les iMOs de la rate semblent avoir un phénotype différent de ceux du foie, car ils expriment plus d'arginases et moins d'iNOS (Terrazas *et al.*, 2017). De plus, comme déjà mentionné, nous avons publié que la plupart des cellules CD11b⁺ Ly6C^{hi} présentes dans la rate au jour 21 pi expriment à leur surface des marqueurs suggérant un phénotype de cellules régulatrices (Abidin *et al.*, 2017; Askenase *et al.* ; Bronte *et al.*, 2016; Hammami *et al.*, 2017). L'observation d'une baisse de la charge parasitaire lorsque le recrutement des monocytes est bloqué ou réduit (Abidin *et al.*, 2017; Terrazas *et al.*, 2017) et l'augmentation de la susceptibilité des monocytes au parasite lié à l'accumulation du facteur de transcription HIF-1 α (discuté plus en détail dans la section 2.3.1) suggère que *L. donovani* les utilise possiblement pour établir/maintenir l'infection (Abidin *et al.*, 2017; Hammami *et al.*, 2017). Ainsi, avec cet ensemble de données, il est indéniable que les monocytes ont des impacts importants sur la LV et qu'il est nécessaire d'investiguer davantage.

Macrophages

Les macrophages sont des cellules ayant un large éventail de rôles biologiques, car en plus d'être des inducteurs, des régulateurs et des effecteurs dans l'immunité innée et acquise, ils participent aussi aux processus physiologiques associés à la guérison et à la réparation des tissus (Mantovani *et al.*, 2013). Dans le cadre d'une infection par *L. donovani*, la littérature indique que les macrophages jouent des rôles contradictoires. En effet, ils servent de lieu de vie et de réplication pour les parasites. Ceux-ci manipulent ou inhibent les réponses des macrophages afin de permettre leur croissance intracellulaire (Arango Duque & Descoteaux, 2015).

Cependant, les macrophages sont aussi importants dans l'élimination du parasite. Effectivement, ils peuvent les détruire directement suite à une phagocytose efficace ou indirectement par la synthèse de différents médiateurs de la réaction inflammatoire comme des cytokines (TNF, IL-1, IL-6, IL-12), facteurs chimiotactiques (MIP-1a, MCP-1),

médiateurs lipidiques et espèces d'oxygène réactifs, qui à leur tour, influencent les actions des autres cellules et mènent éventuellement à la lyse intracellulaire (Filippi *et al.*, 2001). Cette dernière est assurée par la production de dérivés actifs de l'oxygène (ROS), mais surtout par la voie du monoxyde d'azote (NO) qui, comme déjà mentionné dans cette revue de littérature, joue un rôle essentiel dans la destruction des parasites.

Afin d'assumer pleinement leurs fonctions effectrices leishmanicides, les macrophages doivent être stimulés adéquatement. Comme bien d'autres cellules immunitaires, la nature des signaux présents dans le milieu lors de l'infection est d'une grande importance. En effet, une stimulation avec cytokines associées aux lymphocytes Th1, notamment IFNγ, leur permet d'acquérir une fonction effectrice aiguë contre les pathogènes intracellulaires. Ce sont des macrophages que l'on dit classiquement activés ou de phénotype M1. Inversement, s'ils sont stimulés par un milieu avec cytokines associées aux lymphocytes Th2, c.-à-d. IL-4, IL-13, IL-33, TGF-β et IL-10 (Martinez *et al.,* 2009), il y a polarisation vers un phénotype M2 ou autrement appelé activation alternative. Les macrophages avec ce phénotype sont capables d'empêcher l'immunité protectrice contre *L. donovani* (Mukhopadhyay *et al.,* 2015). L'importance de cette dualité entre phénotypes M1/M2 lors de la LV nécessite cependant encore des éclaircissements.

Cellules dendritiques

La recherche des dernières décennies commence à mettre de l'avant l'importance des cellules dendritiques pour l'immunité. Effectivement, ces cellules peuvent être vues comme lien essentiel entre les systèmes immunitaires inné et adaptatif puisque leur fonction principale est la présentation antigénique aux lymphocytes T naïfs. Au départ dérivées de la moelle osseuse, les DCs sont des cellules très hétérogènes tant dans leur apparence que dans leur fonction et peuvent être séparée en deux lignées, celles provenant de la lignée myéloïde (en majorité) ou celles provenant de la lignée lymphoïde (en minorité). Bien que leur spécialité soit la présentation antigénique, les DCs font aussi de la phagocytose, surtout lorsqu'elles sont immatures et circulantes dans la périphérie. Elles produisent aussi une grande variété de cytokines qui influencent le type de réponse

des cellules T et ceci dans le but que la réponse soit adaptée contre l'agent pathogène à combattre (Alberts *et al.*, 2011).

Dans le cadre de la LV, les interactions entre le parasite et les DCs sont complexes et impliquent des fonctions contradictoires (Soong, 2008). Celles-ci peuvent alors stimuler ou restreindre les réponses des lymphocytes T, ou encore mener au contrôle de l'infection ou à la progression de la maladie (Soong, 2008). En effet, les DCs sont essentielles dans la mise en place de la réponse Th1, car ce sont elles qui transforment les antigènes de *Leishmania* pour les présenter aux cellules T naïves (Mougneau *et al.*, 2011). De plus, ce sont elles qui produisent la vague d'IL-12 nécessaire au développement de la réponse de type Th1 (Gorak *et al.*, 1998). Les DCs spléniques sont aussi capables de produire de l'IL-23p19 (Maroof & Kaye, 2008), qui associé avec d'autres cytokines présentes dans le microenvironnement splénique promeut la différenciation des cellules T CD4⁺ en Th17 (Zhu *et al.*, 2010). Population cellulaire qui semble avoir un rôle plutôt important dans la résolution de l'infection (Ghosh *et al.*, 2013).

Cependant, la recherche scientifique a montré que les parasites *L. donovani* peuvent entrer et survivre à l'intérieur des DCs. Ces dernières peuvent donc être utilisées contre le système immunitaire par les parasites. En effet, il est publié que *L. donovani* inhibe la maturation des DCs et modifie leur expression de CCR7 ce qui résulte en l'altération de leur migration vers le manchon lymphoïde périartériolaire (Ato *et al.*, 2002; Tejle *et al.*, 2008). De plus, il semble que par la production combinée des cytokines IL-12, IL-27 et IL-10, les DCs infectées favorisent la différenciation des cellules T CD4⁺ en Tr1 et ainsi permettent la diminution des capacités leishmanicides des macrophages (Owens *et al.*, 2012; Resende *et al.*, 2013). En parallèle, notre laboratoire a publié que par l'expression de PD-L1, les DCs jouent un rôle important dans l'épuisement des cellules T CD8⁺ observé lors de la LV expérimentale. De plus, le milieu inflammatoire lors de la LV induit HIF-1α qui empêche la production d'IL-12 et augmente la production d'IL-10 par les DCs ce qui limite l'expansion des cellules T (Hammami *et al.*, 2015). Ainsi, avec cet ensemble de données, il est manifeste que les DCs jouent un rôle suppresseur durant la LV. Puisque durant la phase chronique, la majorité des DCs dérivent de monocytes inflammatoires (Hammami *et al.*, 2018) et qu'elles sont aussi essentielles au développement des réponses immunitaires acquises, il est évident que davantage d'investigations sont nécessaires pour le développement de prophylaxie ou de thérapie.

2.3 Inflammation et hypoxie

Le terme « inflammation » désigne en fait une séquence d'événements complexes et très organisés dans laquelle l'organisme réagit à une situation potentiellement dangereuse dans le but de se défendre et de reconstruire l'intégrité de ses tissus s'il y a lieu. Les réactions inflammatoires peuvent être activées par un grand nombre d'éléments dont bien entendu l'invasion de l'hôte par des agents pathogènes (Egners et al., 2016). Trois des quatre signes classiques de l'inflammation : la chaleur, le gonflement, la rougeur sont basés sur l'augmentation du flux sanguin et de la perméabilité vasculaire, qui sont directement associés avec la distribution altérée de l'oxygène dans les zones inflammées. Or, même si une augmentation du flux sanguin suggère un meilleur apport d'oxygène, les zones inflammées sont généralement très hypoxiques (Ott, 1987; Sawyer et al., 1991; Silver, 1975). Traditionnellement, l'hypoxie est expliquée par la diminution de la diffusion de l'oxygène due à l'augmentation de la pression interstitielle (gonflement) et de la consommation d'oxygène par les cellules qui tentent de survivre dans ces conditions difficiles. Cependant, des chercheurs ont observé que des conditions hypoxiques per se sont capables d'induire des réactions inflammatoires, impliquant que le lien entre l'inflammation et l'hypoxie est plus complexe encore (Egners et al., 2016; Eltzschig & Carmeliet 2011).

Pour les cellules, gérer le stress hypoxique ou inflammatoire se fait majoritairement par la stabilisation et l'activation de la sous-unité alpha (HIF-1α) du facteur de transcription clé, HIF-1 (*Hypoxia-Inducible Factor 1*) (Scholz & Taylor, 2013; Semenza, 2012a;

Semenza, 2012b). En effet, la sous-unité HIF-1 α en situation de normoxie est continuellement dégradée par le protéasome. En situation d'hypoxie, d'inflammation ou d'infection, HIF-1 α ne se fait plus dégrader, s'accumule pour finalement se retrouver dans le noyau, puis se lie à d'autres sous-unités pour former un complexe qui agit alors comme facteur de transcription (voir Figure 2) (Gothié & Pouysségur, 2002; Salceda & Caro, 1997). Ainsi, ce dernier peut se lier aux promoteurs qui contiennent la séquence consensus qui se nomme *Hypoxia Response Elements* (HREs) (Charpentier *et al.*, 2016; Semenza *et al.*, 1996; Wenger *et al.*, 2005). Cette liaison permet alors la transcription de plus de 1000 gènes impliqués dans diverses fonctions telles que l'angiogenèse, la prolifération cellulaire, l'apoptose, l'érythropoïèse et la glycolyse en anaérobie pour ne nommer que celles-ci (Charpentier *et al.*, 2016; Gothié & Pouysségur, 2002).



Figure 2 : illustration de la régulation de la sous-unité HIF-1α

En situation de a) normoxie, la sous-unité HIF-1 α subi une hydroxylation par les prolyl hydroxylases (PHD). Ceci entraîne la liaison de la sous-unité à l'oncosuppresseur Von Hippel-Lindau (VHL). L'ubiquitinylation subséquente permet alors la destruction de HIF-1 α par le protéasome. Cependant, en situation b) d'hypoxie, la dégradation est inhibée et il y a accumulation de la protéine. Celle-ci est transloquée au noyau et se lie à d'autres sous-unités pour former un complexe qui agit comme facteur de transcription. La variété de gènes transcrits est très vaste. Image issue de (Carroll & Ashcroft, 2005).

2.3.1 Les rôles de HIF-1α dans les cellules du système immunitaire

La recherche des dernières années a montré que HIF-1 α est détectée dans presque toutes les populations cellulaires du système immunitaire, inné ou adaptatif (Cramer *et al.*, 2003; Jantsch *et al.*, 2008; Walmsley *et al.*, 2005) et qu'il est un élément clé dans le contrôle du métabolisme et des fonctions des cellules immunitaires (Palazon *et al.*, 2014). Chaque type cellulaire semble avoir un motif d'expression génique différent suite à la translocation nucléaire de HIF-1 α (Holmquist-Mengelbier *et al.*, 2006; Keith *et al.*, 2011; Warnecke *et al.*, 2008). Cela implique que l'activation de ce facteur dans les monocytes, les macrophages, les neutrophiles, les DCs ou les lymphocytes induit des rôles différents. Ainsi, même si beaucoup reste encore à être élucidé, les rôles spécifiques de HIF-1 α dans chacune de ces cellules deviennent de plus en plus claires.

Neutrophiles

La littérature abordant l'importance de HIF-1 α dans les neutrophiles explique que cette protéine n'est pas essentielle dans leur développement et leur différenciation, mais qu'elle est cruciale à leur bon fonctionnement lors de l'activation des réponses inflammatoires (Cramer et al., 2003; Egners et al., 2016). En effet, des chercheurs ont montré que HIF-1a permet de prolonger la vie des neutrophiles par l'inhibition de l'apoptose (Charpentier et al., 2016; Walmsley et al., 2005). L'accumulation de HIF-1α dans les neutrophiles permet aussi d'augmenter leur migration et leur adhésion à l'endothélium au site d'infection par l'induction de l'expression de l'intégrine ß2 (Charpentier et al., 2016; Kong et al., 2004). De plus, HIF-1α est essentiel aux neutrophiles pour la production de NO, de protéases (cathepsine G et neutrophil elastase) et de peptides antimicrobiens (Peyssonnaux et al., 2005). Il contrôle aussi l'expression des enzymes clés de la production d'ATP lors de la glycolyse en anaérobie et nécessaires à un fonctionnement effectif chez les neutrophiles. Ainsi, il n'est pas étonnant que l'absence de HIF-1α dans les cellules myéloïdes entraîne la perte des réserves d'ATP intracellulaire résultant en la détérioration profonde des réponses inflammatoires. Il y a alors chez les neutrophiles diminution de l'agrégation, de la mobilité,
de l'invasion et des capacités de tuer (Cramer *et al.*, 2003; Peyssonnaux *et al.*, 2005). Au final, la protéine HIF-1 α est cruciale au bon fonctionnement des neutrophiles lors de l'activation des réponses inflammatoires.

Monocytes et macrophages

Il y a peu de littérature scientifique se concentrant uniquement sur le rôle de HIF-1 α dans les monocytes, puisque ceux-ci sont intimiment liés aux macrophages. Ainsi, cette revue de littérature résume plutôt la recherche scientifique effectuée sur les macrophages. En effet, la recherche portant sur les rôles de HIF-1α dans les macrophages a montré que cette protéine n'est pas requise pour leur différenciation, mais qu'elle est cruciale au développement de leurs fonctions en condition d'hypoxie/d'inflammation (Oda et al., 2006). En effet, les macrophages tuent et phagocytent mieux dans des conditions hypoxiques que normoxiques (Anand et al., 2007; Charpentier et al., 2016; Peyssonnaux et al., 2005). L'inactivation génique conditionnelle de HIF-1α dans les cellules myéloïdes via le promoteur LysM (système Cre-loxP) a montré que la production de TNF et la synthèse d'oxyde nitrique chez les macrophages sont dépendantes de cette protéine (Peyssonnaux et al., 2005). Il est ainsi normal d'observer chez les souris avec inactivation de HIF-1α dans les cellules myéloïdes une baisse de production de cytokine par les macrophages, ainsi qu'une réduction de l'infiltration des cellules myéloïdes dans les modèles d'inflammation classiques. De plus, des chercheurs ont montré que HIF-1a augmente la migration des macrophages au site d'infection par l'induction de l'expression des gènes Cdc42 et Rac1 (Charpentier et al., 2016; Kong et al., 2004). Tandis que dans le cas des macrophages associés aux tumeurs, la stabilisation de HIF-1α promeut la polarisation vers le type M2 (Colegio et al., 2014). Ainsi, la littérature scientifique montre plusieurs rôles de HIF-1α dans les macrophages et l'importance de l'activation de ce facteur de transcription dans les réponses immunitaires. Il reste cependant encore des questionnements à élucider et surtout en ce qui concerne les rôles de HIF-1α dans les monocytes.

Cellules dendritiques

Les connaissances scientifiques accumulées sur les effets de HIF-1 α dans les DCs sont contradictoires. En effet, l'unique accumulation de HIF-1 α dans les DCs ne semble pas engendrer d'effet sur leur maturation (Elia *et al.*, 2008). Ceci étant dit, l'accumulation de HIF-1 α dans les DCs accompagnée par la liaison des TLRs (Jantsch *et al.*, 2008) induit une modification métabolique similaire à celle observée dans les cellules immunitaires activées, c-à-d. dépendant de la glycolyse en anaérobie pour supporter leur maturation de HIF-1 α par inhibition pharmacologique des prolyl hydroxylases (PHD) augmente l'expression de CMH et de molécules costimulatrices, ce qui induit alors une plus grande prolifération de cellules T et de plus grands titres d'anticorps lors d'immunisation avec albumine (Bhandari *et al.*, 2013; Palazon *et al.*, 2014).

En situation d'hypoxie ou d'inflammation, l'accumulation de HIF-1a dans les DCs affecte leur survie, leur activation et leurs fonctions (Jantsch et al., 2008; Naldini et al., 2012; Scholz & Taylor, 2013). L'état d'hypoxie induit l'augmentation de l'apoptose des DCs immatures, mais étonnement pas chez les DCs matures (Naldini et al., 2012; Scholz & Taylor, 2013). L'ablation de HIF-1 α dans les DCs inhibe leur maturation et diminue leur capacité à stimuler les cellules T (Jantsch et al., 2008; Scholz & Taylor, 2013), suggérant que cette protéine est importante pour l'induction des réponses immunitaires dans les tissus à faible niveau d'oxygène. Cependant, en cas d'hypoxie prolongée, on observe que HIF-1α dans les DCs engendre la régulation à la baisse des molécules costimulatoires et altère l'expression du récepteur CCR7, nécessaire à la migration des DCs matures aux organes lymphoïdes secondaires (Mancino et al., 2008; Qu et al., 2005; Zhao et al., 2005). De plus, nous avons publié que l'accumulation de HIF-1α dans les DCs CD11c^{hi} entrave leur expression d'IL-12 et augmente leur expression d'IL-10 (Hammami et al., 2018; Hammami et al., 2015). Ainsi, les observations sur la modulation des fonctions des DCs sous hypoxie chronique suggèrent que HIF-1α est peut-être une sécurité contre la réactivité immunitaire envers les tissus endommagés. Dans le cas d'une infection chronique, où une activation excessive des cellules T peut être nuisible

pour l'hôte, ce mécanisme d'autodéfense est probablement de première importance (Charpentier *et al.*, 2016) et ceci incite à des investigations scientifiques plus approfondies.

Lymphocytes T

La littérature scientifique portant sur HIF-1 α dans les cellules T indique que la stabilisation de la protéine arrive dans diverses situations (Gaber *et al.*, 2009) et influence leurs réponses (Gaber *et al.*, 2009; Hangai-Hoger *et al.*, 2004; Hangai-Hoger *et al.*, 2007; Higashiyama *et al.*, 2012; Holmquist-Mengelbier *et al.*, 2006; Ohhashi *et al.*, 2005). Cette stabilisation semble avoir plusieurs effets sur les réponses cellulaires (McNamee *et al.*, 2013). En effet, il a été montré par plusieurs publications que la protéine agit comme un régulateur négatif des réponses cellulaires T (McNamee *et al.*, 2013). L'activation des cellules T déficientes en HIF-1 α a montré une régulation à la hausse des cytokines pro-inflammatoires suite à l'activation des cellules T (Lukashev *et al.*, 2006; Thiel *et al.*, 2007). De plus, un autre groupe de chercheurs (Ben-Shoshan *et al.*, 2008) ont montré qu'en condition d'hypoxie, HIF-1 α régule négativement les fonctions effectrices des cellules T CD4⁺ et CD8⁺, et augmente la fréquence et l'efficacité des lymphocytes T régulateurs (Treg) (Ben-Shoshan *et al.*, 2008).

Cependant, d'autres publications ont montré que HIF-1α semble promouvoir la production de cellules pro-inflammatoires T auxiliaires de type 17 (Th17) en même temps que d'être un régulateur négatif pour la production de Treg (Dang *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2011). En effet, les cellules T déficientes en HIF-1α ont une présence augmentée de Treg et une différenciation des Th17 altérée.

Ainsi, la stabilisation de HIF-1 α dans les cellules T semble avoir des rôles multiples sur leurs réponses. Cependant, d'autres questionnements émergent de ces publications. Comment cette protéine peut-elle avoir des rôles aussi divergeants dans un même type cellulaire ? Ou encore quel rôle joue-t-elle dans des types de cellules T plus rares/non conventionnels (McNamee *et al.*, 2013)?

39

2.3.2 HIF-1α et Leishmania donovani

Lors des leishmanioses murines, on retrouve un ensemble d'événements indicateurs d'un microenvironnement hypoxique : forte inflammation, microcirculation altérée, destruction de tissus, augmentation des demandes métaboliques et de la vascularisation (Grimaldi & Tesh, 1993). Il n'est donc pas surprenant que l'on puisse observer à la suite d'analyses de tissus spléniques de souris infectées qu'il y ait stabilisation et accumulation de HIF-1 α dans les macrophages, qu'ils soient infectés ou non (Arrais-Silva *et al.*, 2005; Hammani *et al.*, 2017). Cependant, le microenvironnement hypoxique n'est pas le seul responsable de l'augmentation de la stabilisation de la protéine ; le parasite, lui aussi, y contribue directement. En effet, des expériences *in vitro*, ont montré que *L. donovani* induit la stabilisation de HIF-1 α dans les phagocytes mononucléaires et les DCs autant chez les cellules humaines que murines (Singh *et al.*, 2012). L'induction de la stabilisation de HIF-1 α se fait par un mécanisme qui implique l'inhibition de l'activité des PHD (voir Figure 2) par l'épuisement des réserves cellulaires de fer, cofacteur essentiel à l'hydroxylation de la protéine par les PHD. HIF-1 α n'est donc plus dégradé par le protéasome et peut se transloquer au noyau pour agir comme facteur de transcription (Singh *et al.*, 2012).

Lors de la leishmaniose viscérale expérimentale, il semble que HIF-1 α soit fondamental pour la croissance intracellulaire du parasite à l'intérieur des macrophages. Il n'est cependant pas clair encore en quoi exactement la stabilisation est nécessaire (Singh *et al.*, 2012). Dans notre laboratoire, nous avons publié que *L. donovani* engendre la stabilisation de HIF-1 α dans les DCs en générant un microenvironnement hautement proinflammatoire (Hammami *et al.*, 2015). Cette réponse inflammatoire est principalement induite par le facteur de transcription *Interferon Regulatory Factor-5* (IRF-5), qui est responsable de l'activation de plusieurs gènes de cytokines proinflammatoires importantes telles que l'IL-6 et le TNF (Paun *et al.*, 2011). C'est en travaillant avec des souris ayant une délétion de HIF-1 α dans les cellules CD11c⁺ (DCs et macrophages activés) que nous avons mis en évidence les conséquences fonctionnelles liées à la stabilisation de HIF-1 α . En effet, la régulation à la hausse de HIF-1 α est nuisible à l'expression soutenue de l'IL-12 dans les DCs spléniques et augmente l'expression d'IL-

40

10 (Hammami *et al.*, 2015). Ainsi, l'absence de HIF-1 α dans les DCs conventionnelles (cDCs [CD11c^{hi}]) durant la LV expérimentale résulte en une augmentation de l'expansion des cellules T CD8⁺, avec une plus grande fréquence d'effecteurs, et une charge parasitaire significativement plus basse. De plus, l'étude des souris déficientes en IRF-5 avec LV a montré que l'expression de HIF-1 α dans les cDCs spléniques n'est pas induite par le parasite en lui-même, mais par l'environnement inflammatoire puisqu'on y voit une forte réduction de la stabilisation de HIF-1 α dans les DCs (Hammami *et al.*, 2015).

Une collaboration avec les membres du laboratoire de Krista Heinonen a permis de montrer que l'activation de HIF-1a exacerbe l'infection dans la moelle osseuse. Effectivement, les souris déficientes en HIF-1α dans les cellules CD11c⁺ ont 50% moins de parasites dans la moelle osseuse (Hammami et al., 2017). De plus, Il semble que l'activation de HIF-1a diminue la production de progéniteurs de monocytes et de monocytes inflammatoires et rend les monocytes/macrophages en stade de différenciation plus susceptibles à l'invasion parasitaire. L'étude des cellules myéloïdes (CD11b⁺) spléniques lors de la LV avec le modèle de souris déficiente en HIF-1α dans les cellules CD11c⁺ a permis de montrer que l'activation de HIF-1α lors de la LV pousse leur différenciation vers le phénotype macrophage M2, délétère à la réponse anti-Leishmania. En effet, en l'absence de HIF-1a, les cellules myéloïdes expriment moins les gènes pour TNF, arginase, Fizz1, Mgl1 et Mgl2 et expriment davantage iNOS (Hammami et al., 2017). De plus, il semble que cette activation induit aussi un phénotype immunorégulateur similaire à celui des MDSC. Au jour 28 de l'infection, les cellules CD11b⁺ sont capables d'inhiber la réponse Th1 suggérant que ces cellules sont similaires à des MDSC et impliquant que ce facteur de transcription est associé à la diminution des capacités anti-Leishmania et dans l'augmentation des capacités inhibitrices cellulaires (Hammami et al., 2017).

En conclusion, la littérature scientifique montre que *L. donovani* peut stabiliser HIF-1α directement en inhibant l'activité des PHD dans la cellule hôte ou indirectement en générant un microenvironnement qui favorise l'induction de la protéine. Cette stabilisation a des impacts négatifs sur les DCs et les macrophages, mais aussi sur l'ensemble des

cellules myéloïdes, car celles-ci sont alors plus susceptibles à l'invasion parasitaire et sont poussées vers un phénotype immunorégulateur qui ressemble à celui des MDSCs, inhibant ainsi la réponse Th1 (Hammami *et al.*, 2017; Hammami *et al.*, 2015). Finalement, il est possible de dire que durant la LV, la stabilisation de HIF-1 α est cruciale au parasite car cela lui permet de survivre à l'intérieur des cellules hôtes (Singh *et al.*, 2012), de se protéger des réponses immunitaires adaptatives et d'établir l'infection chronique (Charpentier *et al.*, 2016).

2.4 Hypothèses de travail et objectifs

Notre laboratoire a publié que l'accumulation de HIF-1 α dans les cellules dendritiques altère leurs fonctions au détriment de la réponse cellulaire T CD8⁺ et CD4⁺ contre le parasite (Hammami *et al.*, 2018; Hammami *et al.*, 2015). Ainsi, puisque les cellules myéloïdes (neutrophiles, cellules dendritiques, monocytes et macrophages) sont la première ligne de défense contre les microorganismes envahissant, que *L. donovani* a un tropisme pour les macrophages et les monocytes (Abidin *et al.*, 2017), et qu'en cas de persistance d'une infection les cellules myéloïdes activent les cellules de la réponse immunitaire adaptative, nous avons émis l'hypothèse que l'ablation de la protéine HIF-1 α dans les cellules myéloïdes engendrera de meilleures réponses immunologiques contre *L. donovani.* C'est-à-dire de meilleures réponses Th1 et une l'inflammation, ainsi qu'une charge parasitaire moins importante de la rate. De ce fait, l'objectif de cette première partie de projet de maîtrise était de mieux définir le rôle de la protéine HIF-1 α dans les réponses immunitaires induites par les cellules myéloïdes lors de la LV expérimentale.

De plus, malgré le fait que la LV soit traitée depuis des décennies, aucun des traitements utilisés n'est considéré comme idéal pour cause de haute toxicité, de problèmes de résistances, de coûts trop élevés, de longueur de traitement ou encore pour cause de mode d'administration inadéquat (Freitas-Junior *et al.*, 2012). Ainsi, il est essentiel de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques et de développer de nouveaux traitements. HIF-1α peut être choisi comme cible thérapeutique car même s'il reste encore à comprendre pourquoi, il est publié que HIF-1α est nécessaire à la survie intracellulaire de

42

L. donovani dans les macrophages (Singh *et al.*, 2012). En outre, l'activation de HIF-1 α dans les cellules CD11c⁺ (cellules dendritiques, monocytes et macrophages activés) lors de la LV diminue l'accumulation de monocytes inflammatoires à la rate, pousse les cellules myéloïdes à développer un phénotype immunosuppresseur similaire à celui des MDSCs (Hammami *et al.*, 2017) et est délétère aux fonctions des DCs (Hammami *et al.*, 2015). Ainsi, jusqu'à maintenant la littérature scientifique tend à la conclusion que l'accumulation de HIF-1 α est nuisible à la réponse immunitaire contre *L. donovani*. Donc, empêcher l'accumulation de cette protéine lors de la LV pourrait être une cible thérapeutique à examiner. De ce fait, l'hypothèse de la deuxième partie de ce projet de maîtrise était qu'une thérapie qui permet de réduire HIF-1 α durant la phase chronique de la LV expérimentale permettrait de diminuer l'inflammation et la charge parasitaire splénique. Pour cela, l'objectif était d'effectuer une thérapie pour diminuer HIF-1 α et de déterminer s'il y a amélioration des réponses immunologiques contre la LV.

3 MATÉRIEL ET MÉTHODE

3.1 Obtention d'un lignée de souris déficientes en HIF-1α dans les cellules myéloïdes

La production de souris avec ablation conditionnelle de HIF-1α dans les cellules myéloïdes s'est fait par l'achat chez *The Jackson Laboratory* et le croisement de deux souches de souris, une avec génotype *C57BI/6 Hif1a^{f/f}* (B6.129-*Hif1a^{tm3Rsjo/J}*) et une de génotype *C57BI/6 LysM-Cre*⁺ (B6.129P2-*Lyz2^{tm1(cre)/fo/J*) (voir les résultats, section 4.1). Le génotypage des souris issues de ce croisement s'est fait par PCR de l'ADN extrait de la peau des oreilles des souris. Les amorces utilisées sont les suivantes : *Hif1a Loxp* For 5'-GCA GTT AAG AGC ACT AGT TG-3', *Hif1a Loxp* Rev 5'-GGA GCT ATC TCT CTA GAC C-3', *Cre* For 5'-GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC-3' et *Cre* Rev 5'-GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT-3'.}

3.2 Utilisation de parasite Leishmania donovani

3.2.1 Purification de parasites

Afin d'infecter les souris pour les expériences, une rate de souris *C57Bl/6 Rag1^{-/-}* (*The Jackson Laboratory* - B6.129S7-*Rag1^{tm1Mom}* ; souris déficiente en lymphocytes T et B matures) infectées d'au moins 3 mois avec *L. donovani* de souche LV9 est prélevée. L'organe est découpé en petits morceaux à l'aide de scalpels et les morceaux transférés dans un tube de 15 mL contenant 3 mL de collagénase D 0,4 mg/mL (Worthington, #43E14253) diluée dans du RPMI non supplémenté. La digestion se fait à température pièce pendant 35 min avec rotations constantes. Une fois l'incubation terminée, les morceaux sont écrasés à l'aide d'un piston de seringue 3 mL stérile dans un tamis cellulaire de 100 µm posé sur un tube de 50 mL. Du RPMI non supplémenté est ajouté à la suspension pour que celle-ci atteigne 20 mL, puis elle est lavée afin d'éliminer la collagénase (10 min à 3100 rpm, température pièce). Le surnageant est jeté et le culot resuspendu dans 20 mL de RPMI contenant de la saponine [0,5 mg/mL] (Sigma, #84510)

afin de lyser les cellules spléniques. Après incubation de 5 min avec légères agitations à température pièce, la suspension est lavée 4 fois avec RPMI jusqu'à 50 mL. Le culot d'amastigotes résultant est alors resuspendu dans 1 mL de RPMI et homogénéisé en étant aspiré et rejeté plusieurs fois à l'aide d'une seringue stérile avec aiguille 26G. La suspension est mise à un volume de 10 mL et 4 uL sont ajoutés dans la chambre *Thoma* (Pyser-SGI, #02C00606) afin de faire le décompte des parasites. Une fois la quantité de parasites déterminée, la concentration de la suspension est ajustée afin d'injecter par voie intraveineuse 2x10⁷ amastigotes par souris.

3.2.2 Production de parasites fixés

Les parasites qui ne sont pas utilisés pour l'infection des souris sont fixés afin d'être utilisés pour les stimulations des cellules T *ex vivo* avec cellules dendritiques dérivées de la moelle (BMDCs) (voir section 3.5). Pour cela, les amastigotes sont mis à une concentration de 10⁹ amastigotes/mL et le même volume d'une solution de formaldéhyde à 4% (PFA 4% ; PBS 1X supplémenté avec 4% de paraformaléhyde) est ajouté. La suspension est mélangée et incubée 30 min sur glace. Par la suite, la suspension est lavée 3 fois (3100 rpm, 10 min à température pièce) avec du RPMI non supplémenté. Une fois les parasites fixés, ils sont resuspendus dans du RPMI complet (c.-à-d. supplémenté de 10% FBS et 10% Pénicilline-Streptomycine-Glutamine [PSG]) à une concentration de 2x10⁸/mL et transférés dans des Eppendorfs pour être entreposés à - 20°C.

3.3 Utilisation de cellules dendritiques dérivées de la moelle osseuse (BMDCs)

3.3.1 Production de BMDCS

Afin de produire des BMDCs, des souris naïves *C57Bl/6* sont euthanasiées au CO₂ et aspergées d'éthanol 70%. Les fémurs sont récoltés, aspergés d'éthanol puis transférés

dans un tube de 15 mL contenant du PBS 1X à 4°C. Une fois au laboratoire, ils sont transférés dans un pétri et les extrémités sont découpées à l'aide de scalpels. Le contenu cellulaire est poussé à l'extérieur des os par injection de IMDM complet (c.-à-d. supplémenté de 10% FBS et 10% PSG) supplémenté de 5% facteur de stimulation des colonies de granulocytes-macrophages (GM-CSF ; provenant d'une lignée cellulaire X63) à l'aide d'une seringue à aiguille 26G.

La suspension de cellules non-adhérentes récoltée dans un tube est mise à un volume de 6 mL et partagée dans 6 pétris. Ces derniers sont remplis avec 9 mL de IMDM complet supplémenté de 5% GM-CSF et incubés à 37°C, 5% CO₂ pendant 3 jours. Au jour dit, 20 mL de IMDM complet supplémenté de 5% GM-CSF sont ajoutés à chaque pétris, puis incubés de nouveau dans les mêmes conditions. Après 4 jours, les BMDCs sont prêtes à être utilisées (Lutz *et al.*, 1999).

3.3.2 Préparation de BMDCs pour stimulation de cellules T

Le jour avant la stimulation, les BMDCs sont récoltées, mises à une concentration de 2x10⁵/mL dans du RPMI complet et des amastigotes LV9 fixés sont ajoutés pour un ratio 1:10. 1 mL de ce mélange est transféré dans chaque puits d'une plaque de 24 puits ou selon le nombre de plaques nécessaire. L'incubation se fait durant la nuit à 37°C, 5% CO₂.

Au moment de la stimulation, 400 µL de milieu est enlevé de chaque puits avant l'ajout des cellules de rate/foie.

3.4 Récolte d'organes et suspensions cellulaires

Aux moments d'infection choisis, tous les animaux sont euthanasiés au CO₂. Les souris sont pesées et leurs poids notés. Puis, leurs abdomens sont aspergés d'éthanol 70% et ouverts à l'aide de ciseaux et forceps. Les foies sont d'abord perfusés avec du PBS 1X afin d'éliminer le sang comportant des cellules circulantes. Puis, les foies et les rates sont

récoltés dans des tubes de 15 mL contenant du PBS 1X et placés sur la glace jusqu'au retour au laboratoire où chaque organe est pesé individuellement.

Un petit morceau découpé de chaque organe est utilisé afin de faire des empreintes sur une lame de microscope. Cette dernière est alors immergée de méthanol afin de fixer les cellules et est utilisée pour déterminer la charge parasitaire (voir section 3.5).

Un petit morceau découpé de chaque rate est recouvert d'*O.C.T. Compound* (Fisher Healthcare, #4585) et conservé à -80°C pour faire des cryosections (voir section 3.9).

Les rates et les foies sont mis en suspensions cellulaires après digestion par collagénase D (à l'exception des rates récoltées pour la deuxième partie du projet qui sont directement mises en suspensions cellulaires). Les organes sont découpés en petits morceaux à l'aide de scalpels et transférés dans des tubes de 15 mL contenant 3 mL (pour les rates) ou 5 mL (pour les foies) de collagénase D [0,4 mg/mL] diluée dans du RPMI non supplémenté. La digestion se fait à température pièce pendant 30 min (pour les rates) ou 40 min (pour les foies) avec rotations constantes. Une fois l'incubation terminée, les morceaux sont écrasés à l'aide d'un piston de seringue 3 mL stérile dans un tamis cellulaire de 100 µm posé sur un tube de 50 mL.

Pour les rates, du PBS 1X est ajouté aux suspensions pour que celles-ci atteignent 20 mL et lavées par centrifugation (7 min à 1200 rpm, 4°C) afin d'éliminer les débris cellulaires. Les culots cellulaires sont resuspendus de façon homogène dans 20 mL de PBS 1X et un décompte cellulaire est effectué avec 10 µL de chaque suspension dans une chambre *Levy double* (VWR scientifific, #15170-208). Les différentes utilisations des suspensions de splénocytes sont décrites aux sections 3.5, 3.6 et 3.7. N.B. Les suspensions de splénocytes pour la section 4.2 n'ont pas subi d'isolation par colonnes magnétiques ; +/- 1 million de cellules de chaque suspension cellulaire sont placéees dans un tube de 1,7 mL, mises en culot (5 x g, 5 min) et entreposées à -150°C jusqu'à ce que les cellules soient utilisées (voir sections 3.8 et 3.9).

Pour les foies, du RPMI non supplémenté est ajouté aux suspensions pour que celles-ci atteignent 20 mL, puis les cellules sont centrifugées 5 min à 500 rpm. Les surnageants sont transférés dans un autre tube de 50 mL et rempli de RPMI complet pour un lavage ordinaire. Les surnageants sont jetés et les cellules resuspendues dans 3 mL de Percoll[™]

48

(GE Healthcare, #17-0891-01) dilué à 40% dans du RPMI complet. Ces volumes sont transférés délicatement sur 3 mL de Percoll[™] dilué à 70% dans du RPMI complet contenu dans un Falcon de 15 mL. Les tubes sont ensuite centrifugés 20 min à 1700 rpm à température pièce sans accélération ni freinage. Une fois la séparation terminée, les débris se trouvant sur le dessus sont jetés et les lymphocytes, se trouvant à l'interface des deux concentrations de solutions, sont récoltés puis lavés 2 fois avec RPMI complet. L'utilisation des lymphocytes hépatiques est décrite à la section 3.6.

3.5 Charge parasitaire

3.5.1 Leishman Donovan Units (LDU)

Les lames avec empreintes d'organes (section 3.4) sont utilisées pour l'évaluation de la charge parasitaire. Pour cela, elles sont colorées au Giemsa en étant immergées dans une solution contenant 3,6 mL de tampon de Sorenson A, 1,4 mL de tampon de Sorenson B, 45 mL H₂O dd et 5,55 mL solution modifiée de Giemsa (Sigma-Aldrich, #489000) pendant 25 à 35 min avec légères agitations à température pièces. Les lames colorées sont par la suite observées sous microscope à objectif 100X avec huile à immersion. Le nombre de parasites est compté pour 1000 cellules nucléées et, afin de l'exprimer en *Leishman Donovan Units* (LDU), ce nombre est multiplié par le poids de l'organe en gramme (Sacks & Melby, 2001).

3.5.2 Dilutions limites

Pour chaque animal évalué et à partir de sa suspension cellulaire de splénocytes (voir section 3.4), 5 mL sont transférés dans un tube de 15 mL et centrifugés 20 min à 800 x g afin de lyser les cellules. Le culot obtenu est resuspendu dans 5 mL de milieu Schneider complet (c.-à-d. supplémenté de 20% FBS et 10% PSG). À partir de cette suspension, 5 dilutions en séries (1/5, 1/25, 1/125, 1/625, 1/3 125 and 1/15625) sont faites et 70 µL de chaque dilution transférés dans 48 puits d'une plaque de 96 puits à fond plat. Les plaques

sont alors scellées avec parafilm et incubées à température pièce pendant une semaine dans le noir. La détection de promastigotes se fait sous microscope à objectif 20X. Le nombre de parasites est déterminé par le log₁₀(nombre de puits négatifs) versus 1/dilution (Ahmed *et al.*, 2003).

3.6 Cytométrie en flux

3.6.1 Marquage des cellules myéloïdes de la rate

Environ 1 million de cellules de chaque suspension cellulaire de rate digérée (voir section 3.4) sont transférées dans son propre tube de cytométrie libellé, puis lavé avec un tampon de cytométrie (PBS 1X supplémenté avec 1% FBS, 5 mM EDTA et 0,1% azoture de sodium). Afin de bloquer les récepteurs Fc (CD16/32), les suspensions sont d'abord incubées 15 min à 4°C avec 10 μ L de surnageant 2.4G1, puis sont marquées pour les populations myéloïdes avec 10 μ L de sérum de cheval (HS) contenant le mélange d'anticorps dilués (Tableau I). Après 25 min d'incubation à 4°C, les cellules sont lavées, puis fixées avec 100 μ L de PFA 4% pendant 15 min à 4°C. Un dernier lavage avec PBS 1X est fait avant l'acquisition des cellules.

3.6.2 Stimulation ex vivo avec BMDCs

Environ 1 million de cellules de chaque suspension cellulaire de rate (voir section 3.4) sont transférées dans son propre tube de cytométrie libellé et lavées avec du PBS 1X. Les culots sont resuspendus dans 500 μ L de RPMI complet et transférés avec BMDCs et amastigotes fixés pour être incubés à 37°C. Après 4H, du Brefeldin A (1 μ L/mL pour environ 10⁶ cellules comme indiqué par le manufacturier - BD Bioscience, #555029) est ajouté pour 2h d'incubation.

Les lymphocytes isolés des foies sont resuspendus dans 500 µL de RPMI complet supplémenté de Brefeldin A, puis sont transférés avec les BMDCs et amastigotes fixés pour être incubés pendant 4h à 37°C.

3.6.3 Stimulation ex vivo chimique

Environ 1 million de cellules de chaque suspension cellulaire splénique (voir section 3.4) sont transférées dans son propre tube de cytométrie libellé et lavées avec du PBS 1X. Les culots sont resuspendus dans 1 mL de RPMI complet supplémenté de Phorbol myristate acétate (PMA) (concentration finale de 5ng/mL - Sigma-Aldrich, #P8139), lonomycine (concentration finale de 0,5 µg/mL - Sigma-Aldrich, #I0634) et Brefeldin A, puis incubés 4h à 37°C dans leur tube de cytométrie en flux.

3.6.4 Marquages des cellules T CD4⁺ spléniques et hépatiques

Après les différentes incubations, les cellules sont transférées dans leur tube de cytométrie en flux s'il y a lieu et lavées avec tampon de cytométrie. Les culots cellulaires sont premièrement marqués en surface avec 10 μ L de HS avec le mélange d'anticorps dilués (Tableau I). Après 25 min d'incubation à 4°C, les cellules sont lavées puis fixées avec 100 μ L de PFA 4% pendant 15 min à 4°C. La PFA est lavée et les cellules sont ensuite perméabilisées par lavage avec une solution contenant 0,1% de saponine. Les cellules sont marquées pour les cytokines associées à la réponse Th1 (Tableau II) avec 10 μ L de HS avec les anticorps dilués. Après 45 min d'incubation à 4°C, les cellules sont lavées une fois avec une solution de perméabilisation, puis une dernière fois avec du PBS 1X avant d'être passées au cytomètre.

Tableau I : mélanges d'anticorps utilisés pour l'analyse par cytométrie en flux des diverses sous-
populations de cellules myéloïdes retrouvées dans la rate des souris

Anticorps	Dilution	Compagnie	# du Produit	
CD11b-BV421	1:400	BD Horizon [™]	562605	
CD11c-APC	1:400	eBioscience	17-0114-82	
Ly6C-PerCP	1:800	BioLegend	1280028	
Ly6G-PE	1:800	BioLegend	127608	
F4/80-PECy7	1:600	BioLegend	123114	
MHC II-FITC	1:800	BD Pharmingen [™]	553623	
Mélanana O caracterization de collular des des deitéruses de la seta				

Mélange 1 : sous-population de cellules myéloïdes de la rate

Mélange 2 : sous-population de cellules dendritiques de la rate

Anticorps	Dilution	Compagnie	# du Produit
MHC II-FITC	1:800	BD Pharmingen TM	553623
CD11c-APC	1:400	eBioscience	17-0114-82
CD4-PE	1:600	BD Pharmingen TM	557308
CD8-Pacific Blue	1:400	BD Pharmingen TM	558106

Marquage de surface				
Anticorps	Dilution	Compagnie	# du Produit	
CD3-BV421	1:400	BD Horizon [™]	562600	
CD4-FITC	1:400	BD Pharmingen [™]	553729	
Marquage intracellulaire				
Anticorps	Dilution	Compagnie	# du Produit	
TNF-PECy7	1:600	BD Pharmingen [™]	557644	
IFNy-APC	1:400	BD Pharmingen [™]	554413	
IL-10-PE	1:600	BD Pharmingen [™]	554467	

Tableau II : mélanges d'anticorps utilisés pour l'analyse par cytométrie en flux des lymphocytesTh1 des rates et des foies de souris

3.6.5 Acquisition des cellules

500 000 cellules sont acquises par BD LSRFortessa™ cell analyzer (BD), puis analysées avec le logiciel *FlowJo*.

3.7 Isolation des cellules CD11b⁺ de la rate

À partir du reste des suspensions de cellules spléniques (voir section 3.4), les cellules myéloïdes CD11b⁺ sont isolées à l'aide de colonnes MACS. Pour cela, les cellules sont transférées dans des tubes de 15 mL et lavées avec un tampon d'isolation (PBS 1X, 1% FBS et 5 mM EDTA). Les surnageants sont enlevés avec une pipette pasteur et les culots resuspendus dans 90-100 μ L de tampon d'isolation où 10 μ L de billes anti-CD11b (Miltenyi Biotech, # 130-049-601) sont ajoutés. Après incubation de 15 min sur glace, les cellules sont lavées avec tampon d'isolation et resuspendues dans 500 μ L du même

tampon. Ensuite, les cellules sont transférées dans les colonnes MACS MS (Miltenyi Biotech, #130-042-201) suspendues par les supports aimantés et qui ont été préalablement équilibrées avec du tampon MACS. Une fois les colonnes lavées 3 fois avec 500 µL de tampon d'isolation, les colonnes sont séparées des supports aimantés et déposées sur tubes de 15 mL. Les cellules isolées dans les colonnes sont alors récupérées par élution avec 2 mL de tampon d'isolation et 10 uL sont utilisés dans un hématimètre pour compter le nombre de cellules isolées.

Les cellules sont lavées 1 fois avec du PBS 1X et resuspendues dans le même tampon afin d'être à une concentration de 1-2x10⁶/mL. 1 mL de chaque suspension cellulaire est déposé dans un microtube de 1,7 mL, mis en culot (5 x g, 5 min) et entreposé à -150°C jusqu'à ce que les culots cellulaires soient utilisés (voir sections 3.8 et 3.9).

3.8 Immunobuvardage de type Western

3.8.1 Extraction des protéines

Les culots cellulaires préalablement conservés à -150°C (voir sections 3.4 et 3.7) sont lysés avec 100 µL pour 10⁶ cellules de tampon de lyse RIPA (Sigma, #R0278) contenant des inhibiteurs de protéases (cOmplete Mini, #11836153001). Ensuite, les lysats sont centrifugés à 14 000 rpm pendant 15 min à 4°C et les surnageants sont transférés dans un microtube et après quantification, conservés à -80°C.

3.8.2 Quantification des protéines

Les protéines sont quantifiées en utilisant le *Pierce[®] BCA Protein Assay Kit* (Thermo Scientific, #23227) selon les instructions du manufacturier.

3.8.3 SDS-PAGE

35 μg de protéines par échantillon sont mélangés 1:1 avec du tampon de Laemmli supplémenté de 5% β-mercaptoéthanol et chauffés 10 min à 95°C. Les échantillons sont mis en culots et déposés dans les puits d'un gel de polyacrylamide à 10%. La séparation des protéines se fait jusqu'à la sortie du front de migration hors du gel.

Les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose pendant 1h à 0,3 A.

3.8.4 Marquage des protéines d'intérêts

Le transfert terminé, la membrane est bloquée 1h à température pièce avec un tampon de PBS 1X supplémenté de 5% BSA (Bioshop, #ALB001.500) afin de bloquer les interactions non spécifiques. La membrane est rincée légèrement avec PBS 1X et découpée en deux. La partie supérieure à 60 kDa est submergée pour la nuit à 4°C dans un mélange d'anticorps anti-HIF-1 alpha d'une dilution 1:500 (Novus Biologicals, #NB100-105) dans du PBS 1X supplémenté de 5% BSA et 0,02% azoture de sodium. La partie inférieure à 60 kDa est quant à elle submergée pour la nuit à 4°C dans un mélange d'anticorps anti-AIE quant à elle submergée pour la nuit à 4°C dans un mélange d'anticorps anti- β actine d'une dilution 1:1000 (Novus Biologicals, #NB600-501) dans PBS 1X supplémenté de 5% BSA et 0,02% azoture de sodium.

Au matin, les membranes sont lavées 3 fois 15 min avec tampon de lavage (PBS 1X supplémenté de 0,05% Tween-20 [Sigma-Aldrich, #274348]) puis incubées pendant 2 heures à température pièce dans une dilution 1:50 000 d'anticorps anti-IgG de souris couplés avec peroxydase de raifort (GE Healthcare, #NA931V) dans du PBS 1X supplémenté de 5% BSA et 0,05% Tween-20. L'incubation terminée, les membranes sont à nouveau lavées 3 fois 15 min avec tampon de lavage. Finalement, les membranes sont incubées 5 min dans du *ECL Detection Reagents* (GE Healthcare, #RPN2106) puis révélées par chimiluminescence et les signaux capturés par un film photographique.

3.9 PCR en temps réel

Les cellules utilisées proviennent soit de la section 3.4 ou 3.7. et sont conservées à - 150°C jusqu'au jour de leur utilisation.

3.9.1 Extraction d'ARN

L'extraction d'ARN des culots cellulaires est réalisée à l'aide de *RNeasy[®] Mini Kit* (Qiagen 74106) selon les instructions du manufacturier. Les concentrations d'ARN obtenus sont déterminées par *Nanodrop[®] ND-1000* (Thermo Scientific).

3.9.2 Transcription inverse de l'ARN en ADN

1000 µg d'ARN sont transcrits en ADN à l'aide de *iScript*[™] *cDNA Synthesis Kit* (Bio-Rad, #1708890) selon les instructions du manufacturier.

3.9.3 PCR quantitatif en temps réel

Chaque culot cellulaire est évalué en duplicata pour les gènes *HPRT* (contrôle endogène) et *Hif1a* avec iTaqTM Universal SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad, #172-5121) selon les instructions du manufacturier. L'analyse des niveaux d'ARN est faite avec *Stratagene mx3000p Real time PCR System* (Agilent Technologies).

Les amorces utilisées sont : *HPRT* For 5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G-3', *HPRT* Rev 5'-GAT TCA ACC TTG CGC TCA TCT TAG GC-3', *Hif1A* For 5'-CCA CAG GAC AGT ACA GGA-3' et *Hif1A* Rev 5'-TCA AGT CGT GCT GAA TAA TAC C-3' (Hammami *et al.*, 2015).

3.10 Microscopie confocale

3.10.1 Cryosections

Des morceaux de rates conservés à -80°C dans de l'O.C.T. Compound (section 3.3) sont coupés au cryostat à -21°C à 10 µm d'épaisseur. Les lames avec 2 coupes d'organe sont conservées par la suite au -80°C jusqu'au jour du marquage.

3.10.2 Marquage des cellules de la microarchitecture de la rate

Les lames sont dégelées pendant 10 min à température pièce, puis les coupes d'organes sont fixées et perméabilisées avec une solution froide (gardée à -20°C) composée de 75% d'acétone et 25% d'éthanol pendant 10 min. Elles sont ensuite réhydratées dans du PBS 1X filtré à température piècre pendant 10 min, puis 200 µL de solution de blocage (PBS 1X, 5% BSA, 1% anti-récepteur Fc) sont ajoutés sur chaque coupe afin de la recouvrir complètement. Celles-ci sont incubées à température pièce pendant 1h, puis la solution est enlevée par inclinaison des lames et 150 µL de solution de blocage avec anticorps (Tableau III) sont ajoutés. Les lames sont incubées à 4°C pendant la nuit à l'abri de la lumière. La journée même les lames sont observées par microscope à balayage laser confocal, système Zeiss LSM 780, monté avec un Zeiss Axio Observer Z1 et dirigé avec le logiciel Zen 2011 (Zeiss).

 Tableau III : mélange d'anticorps utilisé pour le marquage des cryosections de rates de souris observées par microscopie confocale

Anticorps	Dilution	Compagnie	# du Produit
CD11b-BV421	1:500	BD Pharmingen [™]	562605
B220-FITC	1:500	BioLegend	103206
CD169-AF594	1:500	BioLegend	142416

3.11 Statistiques

Toutes les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel *GraphPad Prism* utilisant un ANOVA à comparaisons multiples ou un t-test de Student avec p< 0,05.

4 RÉSULTATS

4.1 Impacts de l'ablation conditionnelle de la protéine HIF-1α des cellules myéloïdes lors de la leishmaniose viscérale

Notre laboratoire ayant publié que l'accumulation de HIF-1 α dans les cellules dendritiques est délétère à la réponse cellulaire T CD8⁺ et T CD4⁺ contre le parasite (Hammami *et al.*, 2017; Hammami *et al.*, 2018; Hammami *et al.*, 2015), l'hypothèse de cette première partie est que l'ablation de la protéine dans les cellules myéloïdes permettrait de meilleures réponses immunologiques contre *L. donovani*.

Afin de vérifier l'hypothèse, le modèle murin d'ablation conditionnelle *LysM-Cre* a été choisi pour supprimer l'expression de HIF-1 α dans les cellules myéloïdes. Le modèle *LysM-Cre* est connu depuis 1999 (Clausen *et al.*, 1999) et est utilisé avec succès pour l'étude des cellules myéloïdes dans plusieurs publications (Ahn *et al.*, 2014; Cramer *et al.*, 2003; Imtiyaz *et al.*, 2010). Ainsi, l'objectif des expériences faites dans cette première partie est de définir le rôle de la protéine HIF-1 α dans les réponses immunitaires induites par les cellules myéloïdes lors de la LV expérimentale.

4.1.1 Génération de souris avec délétion conditionnelle de HIF-1α dans les cellules myéloïdes

Le système *Cre-lox* permet une délétion contrôlée d'un gène spécifique à un tissu/type cellulaire/organe tout en permettant à la lignée murine de se développer sous le mode d'opération normal du gène d'intérêt. Afin de générer une lignée de souris sans protéine HIF-1α dans les cellules myéloïdes, un croisement entre deux souches de souris, une avec génotype *C57BI/6 Hif1a^{flox/flox}* et une de génotype *C57BI/6 LysM-Cre*⁺, a été mis en place (Figure 3). La première génération (F1) de ce croisement contient environ 50% de souris hétérogyzotes pour l'allèle *Hif1a^{flox}* et le transgène *cre*. Ces dernières, après confirmation du génotype par PCR, ont ensuite été croisées avec des souris *C57BI/6 Hif1a^{flox/flox}* afin d'obtenir des souris homozygotes pour l'allèle *Hif1a^{flox}*. Les souris de la

deuxième génération (F2) ont aussi été génotypées par PCR et les souris *C57Bl/6 Hif1a^{flox/flox} LysM-Cre*⁺, soit environ 25%, ont été identifiées et ont été utilisées pour les expériences. Finalement, leurs congénères *Cre*⁻, identifiés comme *Hif1a^{flox/flox}*, ont été utilisés comme contrôle de type sauvage.



1^{ère} génération (F1) hétérozygote gène "floxé"



2^{ème} génération (F2) homozygote gène "floxé"

Figure 3 : illustration des croisements pour la génération de souris dont un gène est supprimé via le système *Cre-lox*

Un premier croisement doit être fait entre une souris homozygote «floxée», soit avec dans son génome des séquences loxP insérées de part et d'autre du gène cible, et une souris Cre⁺, soit avec

dans son génome une séquence pour la recombinase-Cre sous le contrôle d'un promoteur choisi qui est spécifique à un tissu/type cellulaire/organe. Le deuxième croisement doit se faire entre une souris hétérogyzote pour l'allèle «floxé» et *Cre*⁺ avec une souris homozygote «floxée». La progéniture étant homozygote pour le gène «floxé» et exprimant la recombinase-Cre est celle dont le gène est alors supprimé. Image modifiée issue du site internet de The Jackson Laboratory (Peter, 2018).

4.1.2 Effets biologiques de l'infection par *L. donovani* sur la rate et le foie des souris *Hif1a^{flox/flox}* et *Hif1a^{flox/flox} LysM-Cre*⁺

Chez la souris, l'une des caractéristiques visibles de la LV est l'hépatosplénomégalie, c.à-d. l'augmentation de masse de la rate et du foie. Puisque les cellules myéloïdes jouent des rôles multiples et différents dans les réponses immunitaires et l'inflammation, il a d'abord été évalué que la délétion conditionnelle de HIF-1 α dans les cellules CD11b⁺ affecte cet aspect de l'infection. *Cramer et al.* ayant montré, en utilisant un modèle similaire, que HIF-1 est requis pour la migration des cellules myéloïdes au site d'inflammation (Cramer *et al.*, 2003) l'hépatosplénomégalie a été évaluée à différents temps de l'infection en comparant le poids de l'organe par rapport au poids de l'animal chez les deux groupes de souris infectées (Figure 4**A** et **B**). Ainsi, les résultats obtenus n'indiquent aucune différence d'hépatosplénomégalie entre les deux groupes. D'ailleurs, le compte du nombre de cellules qui étaient présentes dans la rate ne montre pas non plus de différence entre les deux groupes (Figure 4**C**).

Dans des travaux antérieurs, notre laboratoire a observé que l'ablation conditionnelle de HIF-1 α dans les cellules CD11c⁺ (qui inclut les cellules myéloïdes telles que les macrophages activés et certains types de DCs) engendre une diminution de la charge parasitaire lors de l'infection par *L. donovani* (Hammami *et al.*, 2015). Ainsi, la charge parasitaire de la rate a été évaluée par 2 méthodes au cours des différents temps de l'infection. La première méthode, l'analyse par dilutions limites, a été utilisée lors des premiers jours de l'infection quand la charge parasitaire était trop basse pour être évaluée avec précision par la deuxième méthode, la coloration de Giemsa. Par conséquent, aux jours 7 et 14 pi, la charge parasitaire de la rate a été vérifiée par analyse des dilutions limites (Figure 4**D**) et aucune différence n'est vue entre les deux groupes de souris. Également, les mêmes observations ont été faites avec le compte d'amastigotes présents

dans les empreintes colorées au Giemsa aux jours 7, 14, 21 et 28 pi (Figure 4**F**). Ce qui est surprenant, car contraire à ce qui a été observé avec les souris *Hif1a^{flox/flox} Cd11c-Cre*⁺. De plus, l'évaluation de la charge parasitaire dans le foie, faite également par empreintes colorées au Giemsa, n'indiquait pas de différence significative entre les deux groupes (Figure 4**E**). En somme et ce malgré notre surprise, ces résultats suggèrent que l'ablation conditionnelle de HIF-1 α dans les cellules myéloïdes via le système *LysM-Cre* n'affecte pas le cours de l'infection par *L. donovani*.



Figure 4 : effets biologiques de l'infection par *L. donovani* sur la rate et le foie des souris *Hif1a*^{flox/flox} et *Hif1a*^{flox/flox}LysM-Cre⁺

A) et B) représentent l'évaluation de l'hépatosplénomégalie au cours de l'infection. C) représente le nombre de cellules spléniques comptées pour chaque temps de mesure. D) représente l'évaluation de la charge parasitaire des rates par dilutions limites aux jours 7 et 14 pi. E) et F) représentent les

LDU des foies et des rates par décompte des amastigotes observés sur empreintes colorées au Giemsa. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type de la moyenne avec 3 à 4 souris par groupe; pi : post-infection.

4.1.3 L'absence de HIF-1α dans les cellules myéloïdes n'affecte pas leur recrutement à la rate

Des chercheurs ont publié qu'en cas d'inflammation la présence de HIF-1 α dans les cellules myéloïdes est importante pour la mobilité, l'infiltration et l'agrégation de ces cellules *in vitro* et au niveau de la peau (Cramer *et al.*, 2003). Par conséquent, nous avons évalué si l'absence de HIF-1 α engendrait un défaut au niveau du recrutement cellulaire à la rate pour les souris *Hif1a^{flox/flox} LysM-Cre*⁺.

Afin de vérifier cela, les splénocytes ont été marqués pour distinguer différents types de cellules de la lignée myéloïdes et analysés par cytométrie en flux. Le marquage des splénocytes utilisé permet de distinguer les cellules de la lignée myéloïde (CD11b⁺), les neutrophiles (Ly6G⁺), les monocytes (Ly6C⁺), les cellules F4/80⁺ et les DCs (CMH II⁺, CD11c^{hi}). La combinaison de ces marqueurs permet d'abord de mettre à l'écart du reste des analyses les neutrophiles (CD11b^{hi} Ly6G^{hi}), puis de distinguer les monocytes classiques inflammatoires (CD11b^{hi} Ly6C^{hi}) des non-classiques (CD11b^{hi} Ly6C^{lo}). Ensuite, cette combinaison permet d'identifier les cellules myéloïdes CD11b⁺ F4/80⁺, qui regroupent, entre autres, les monocytes et les macrophages. Enfin, le marquage des DCs (CMH II⁺, CD11c^{hi}) peut être poussé avec l'identification des sous-types CD8a⁺ et CD4⁺ (Figure 5**A**). En premier, ce sont les splénocytes de souris naïves qui ont été acquises au cytomètre (Figure 5**B** à **D**). En second, les splénocytes infectés à différents temps d'infection (Figure 5**E** à **K**).

Tout d'abord, l'analyse des résultats obtenus pour les splénocytes naïfs indique que les fréquences des différentes populations de cellules myéloïdes chez les deux types de souris sont les mêmes (Figure 5**B**, **C** et **D**). De plus et avec un étonnement grandissant, l'analyse des résultats obtenus lors des différents temps d'infection ne montre aucune différence de fréquences entre les deux groupes de souris (Figure 5**E** à **K**). Ainsi, les résultats obtenus semblent indiquer que l'ablation conditionnelle de HIF-1α dans les

cellules myéloïdes via le système *LysM-Cre* n'affecte pas le recrutement des cellules myéloïdes vers la rate, ce qui concorde avec la splénomégalie inchangée (Figure 4**A** et **B**).





A) représente la stratégie d'analyse par cytométrie en flux qui a été utilisée pour distinguer les populations myéloïdes trouvées dans la rate des souris $Hif1a^{flox/flox}$ et $Hif1a^{lox/flor}$ LysM-Cre⁺. Les deux groupes de souris naïves présentent les mêmes fréquences de B) sous-populations de cellules CD11b⁺ spléniques incluant les neutrophiles (Ly6G⁺), cellules F4/80⁺, monocytes Ly6C^{hi} et Ly6C¹⁰, C) DCs (MHCII⁺ CD11c^{HI}) et D) 2 sous-types dérivés (CD4⁺ et CD8a⁺). Pour vérifier ces mêmes populations lors de la LV, les souris $Hif1a^{flox/flox}$ et $Hif1a^{flox/flox}$ LysM-Cre⁺ ont été infectées avec des amastigotes *L. donovani* et les splénocytes obtenus aux jours 7, 14, 21 et 28 pi ont été colorés pour divers marqueurs myéloïdes et analysés par cytométrie en flux. Les pourcentages présentés sont pour les E) neutrophiles, F) cellules F4/80⁺, G) monocytes Ly6C^{hi}, H) monocytes Ly6C^{lo}, I) DCs, J) DCs CD4⁺ et K) DCs CD8a⁺. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type de la moyenne avec 3 à 4 souris par groupe ; jpi : jour(s) post-infection ; pi : post-infection.

4.1.4 L'absence de HIF-1α dans les cellules myéloïdes n'engendre pas de différence dans la modification de la microarchitecture splénique

Chez la souris, la splénomégalie est généralement associée à des changements dans la microarchitecture splénique. À partir du jour 14 pi, il y a hypertrophie de la pulpe rouge et destruction de la zone marginale (Kaye *et al.*, 2004). La destruction de la zone marginale est principalement due à la forte concentration de TNF, produit majoritairement par les macrophages, dans le microenvironnement (Engwerda *et al.*, 2002). Puisque notre laboratoire a publié que les cellules myéloïdes issues des souris déficientes en HIF-1 α dans les cellules CD11c⁺ expriment moins de TNF (Hammami *et al.*, 2017), il fallait examiner les effets de l'absence de HIF-1 α dans les cellules CD11b⁺ sur la microarchitecture lors de la LV.

Pour cela, des coupes histologiques ont été faites et ont été visualisées par microscopie confocale. Une première comparaison entre les souris naïves *Hif1a^{flox/flox}* et *Hif1a^{flox/flox} LysM-Cre*⁺ a d'abord été faite comme contrôle (Figure 6**A**). Puis, une deuxième comparaison entre les deux lignées, mais avec des souris infectées à différents temps (Figure 6**B**). Les cellules B (B220⁺, en vert), les cellules myéloïdes (CD11b⁺, en bleu) et finalement les macrophages de la zone marginale (CD169⁺, en rouge) ont été marqués en même temps. La combinaison de ces marqueurs permet de voir la zone marginale qui entoure les follicules de cellules B (pulpe blanche) et les cellules CD11b⁺ principalement situées dans la pulpe rouge. Les résultats obtenus montrent bien l'hypertrophie de la pulpe rouge avec l'accumulation de cellules Myéloïdes (CD11b⁺), la perte de la zone marginale et la diminution des follicules de cellules B, mais contre toute attente aucune

différence importante entre les deux groupes de souris (Figure 6**B**). En somme, malgré nos précédentes observations avec les cellules CD11c⁺ déficientes en HIF-1 α (Hammami *et al.*, 2017), les résultats obtenus ici semblent indiquer que l'ablation conditionnelle de HIF-1 α dans les cellules myéloïdes via le système *LysM*-*Cre* n'affecte pas la modification de la microarchitecture lors de l'infection par *L. donovani*.



Figure 6 : l'absence de HIF-1α dans les cellules myéloïdes n'engendre pas de différence dans la modification de la microarchitecture splénique

A) Représente les coupes histologiques colorées de la rate des souris naïves $Hif1a^{flox/flox}$ et $Hif1a^{flow/flox}LysM-Cre^+$. Les colorations ont été faites pour certains marqueurs spécifiques aux populations de cellules B (B220⁺, en vert), cellules myéloïdes (CD11b⁺, en bleu) et macrophages de

la zone marginale (CD169+, en rouge). B) Représente les coupes histologiques colorées de la rate des souris *Hif1α^{flox/flox}* et *Hif1α^{flox/flox} LysM-Cre*⁺ infectées aux jours 7, 14, 21 et 28 pi. Les barres d'échelle représentent 1000 μm. Grossissement 10X ; jpi : jour(s) post-infection ; pi : post-infection.

4.1.5 Comparaison des fréquences de cellules spléniques T CD4⁺ spécifiques aux antigènes de *L. donovani* chez les souris *Hif1a^{flox/flox}* et *Hif1a^{flox/flox}LysM-Cre*⁺

Les cellules qui sont regroupées dans la lignée myéloïde comprennent certaines cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles (macrophages et certains types de DCs). Puisque celles-ci sont importantes dans l'activation de la réponse immunitaire adaptative, les réponses cellulaires T ont été évaluées et, plus spécifiquement, la sécrétion des cytokines IFNy et TNF par les cellules T CD4⁺, car ce sont ces cytokines qui permettent l'activation des macrophages et des mécanismes d'élimination des parasites (Kaye & Scott, 2011). Pour cela, les cellules T CD4⁺ spléniques ont été stimulés de façon spécifique aux antigènes de L. donovani et analysé par cytométrie en flux. Les résultats obtenus montrent que les fréquences de cellules T CD4⁺ producteurs d'IFNy (Figure 7A et D) et de TNF (Figure 7B et E) chez les deux groupes de souris sont similaires. De même, les fréquences de cellules T CD4⁺ co-productrices d'IFNy et de TNF (Figure 7C et F), associés à la réponse de type Th1, sont similaires entre les deux groupes de souris. Ensemble, ces résultats encore plus étonnants que les derniers, semblent indiquer que l'ablation conditionnelle de HIF-1α dans les cellules myéloïdes par le système LysM-Cre n'affecte pas les réponses de type Th1 lors de l'infection par L. donovani.



Figure 7 : comparaison des fréquences de cellules spléniques T CD4⁺ spécifiques aux antigènes de L. donovani chez les souris Hif1a^{flox/flox} et Hif1a^{flox/flox} LysM-Cre⁺

A) et D) représentent respectivement les graphiques d'analyse de cytométrie en flux et de pourcentages des cellules T CD4⁺ de la rate secrétant de l'IFNγ. B) et E) représentent respectivement la même chose que précédemment, mais pour les cellules T CD4⁺ secrétant du TNF. Tandis que C et F) représentent respectivement les graphiques d'analyse de cytométrie en flux et de pourcentages des cellules T CD4⁺ de la rate étant co-productrices d'IFNγ/TNF. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type de la moyenne avec 3 à 4 souris par groupe; FMO : fluorescence moins un; jpi : jour(s) post-infection.

4.1.6 Comparaison des fréquences de cellules spléniques Tr1 chez les souris *Hif1a^{flox/flox}* et *Hif1a^{flox/flox}LysM-Cre*⁺

Plusieurs laboratoires, incluant le nôtre, ont observé que l'exacerbation de la LV chez la souris corrèle avec l'apparition d'une population T CD4⁺ IL-10⁺ IFN γ^+ durant la phase chronique (Owens *et al.*, 2012; Resende *et al.*, 2013; Stäger *et al.*, 2006). Cette population de cellules co-productrices, nommée Tr1, s'observe aussi chez les humains atteints de LV chronique (Nylen & Sacks, 2007). Puisque ces cellules sont induites par les DCs qui co-produisent de l'IL-10/IL-27 et que l'expression d'IL-10 chez les DCs est régulés par HIF (Hammami *et al.*, 2018; Hammami *et al.*, 2015), il est possible que l'absence de HIF-1 α dans cette lignée de cellules ait un impact sur la production de cellules T CD4⁺ IL-10⁺ IFN γ^+ lors de l'infection.

Afin de vérifier cela, les splénocytes ont été stimulés avec PMA-lonomycine, puis les fréquences de cellules T CD4⁺ co-productrices d'IL-10/IFNγ ont été évaluées par cytométrie en flux. L'utilisation de PMA-lonomycine induit une stimulation non spécifique des cellules, mais permet une meilleure visualisation des Tr1, sans quoi ces dernières sont difficiles à visualiser. Les analyses des splénocytes appartenant aux deux groupes de souris montrent que les fréquences de T CD4⁺ positives pour l'IL-10 (Figure 8**A** et **C**) sont similaires, à l'exception du jour 21 pi ou il semble y avoir une diminution d'expression chez les souris *Hif1a^{flox/flox} LysM-Cre*⁺. Les mêmes observations sont faites avec les fréquences de cellules T CD4⁺ co-productrices d'IL-10/IFNγ (Figure 8**B** et **D**). Cependant, mis à part le jour 21 pi, tous les autres temps ne montrent aucune différence entre les deux groupes de souris. Ainsi, il semble que l'ablation conditionnelle de HIF-1α dans les cellules myéloïdes via le système *LysM-Cre* affecte peu l'expansion des cellules T CD4⁺ IL-10⁺ IFNγ^{+/-} sauf peut-être au moment où l'infection passe de l'état aigue à chronique.



Figure 8: comparaison des fréquences de cellules spléniques Tr1 chez les souris *Hif1a^{flox/flox}* et *Hif1a^{flox/flox} LysM-Cre*⁺

A) et C) représentent respectivement les graphiques d'analyse de cytométrie en flux et de pourcentages des cellules T CD4⁺ de la rate secrétant d'IL-10. Tandis que B) et D) représentent respectivement les graphiques d'analyse de cytométrie en flux et de pourcentages des cellules T CD4⁺ de la rate étant co-productrices d'IFNγ et d'IL-10. Les barres d'erreur représentent l'erreurtype de la moyenne avec 3 à 4 souris par groupe; * indique P < 0,05; ** indique P < 0,01; *** indique P < 0,001 ; FMO : fluorescence moins un; jpi : jour(s) post-infection ; pi : post-infection.

4.1.7 Comparaison des fréquences de cellules hépatiques T CD4⁺ spécifiques aux antigènes de *L. donovani* chez les souris *Hif1a^{flox/flox}* et *Hif1a^{flox/flox} LysM-Cre*⁺

Dans le modèle murin de LV expérimentale, les réponses immunitaires qui se développent au cours de l'infection sont propres à chaque organe. Ainsi, le foie au contraire de la rate, arrive à contrôler la multiplication des parasites après quelques semaines. Ce contrôle se fait par la formation de granulomes autour de cellules de Kupffer infectés et ce processus est dépendant, entre autres, du recrutement de monocytes, neutrophiles, DCs, cellules T CD4⁺ et CD8⁺ et de la production de cytokines inflammatoires (Rodrigues *et al.*, 2016; Stanley & Engwerda, 2007). Puisque les cellules myéloïdes sont importantes dans le développement des réponses immunitaires adaptatives, il est possible que l'absence de HIF-1 α dans cette lignée de cellules ait un impact sur la production de cellules T CD4⁺ IFN γ ⁺ dans le foie lors de l'infection.

De ce fait, les réponses spécifiques des cellules T CD4⁺ du foie ont été évaluées par cytométrie en flux à différents temps d'infection. Étonnement, l'analyse des fréquences des cellules T CD4⁺ productrices d'IFNγ (Figure 9**A** et **D**), TNF (Figure 9**B** et **E**) ou coproductrices d'IFNγ/TNF (Figure 9**E** et **F**) n'indique pas de différence entre les deux groupes à l'exception du jour 21 pi, où moins d'IFNγ semble être produits chez les cellules T CD4⁺ des souris *Hif1a^{flox/flox}LysM-Cre*⁺ (Figure 9**C** et **F**). Cependant, mis à part ce jour, tous les autres temps ne montrent aucune différence entre les deux groupes de souris. Ainsi, dans l'ensemble et en concordance avec les résultats observés dans la rate, nos résultats semblent indiquer que l'ablation conditionnelle de HIF-1α dans les cellules myéloïdes via le système *LysM-Cre* affecte peu, les réponses cellulaires T CD4⁺ du foie sauf peut-être au moment où l'infection passe de l'état aigue à chronique.


Figure 9 : comparaison des fréquences des cellules hépatiques T CD4⁺ spécifiques aux antigènes de *L. donovani* chez les souris *Hif1a^{flox/flox}* et *Hif1a^{flox/flox} LysM-Cr*e⁺

A) et D) représentent respectivement les graphiques d'analyse de cytométrie en flux et de pourcentages des cellules T CD4⁺ du foie secrétant de l'IFN γ . B) et E) représentent respectivement la même chose que précédemment, mais pour les cellules T CD4⁺ du foie secrétant du TNF. Tandis que C) et F) représentent respectivement les graphiques d'analyse de cytométrie en flux et de pourcentages des cellules T CD4⁺ du foie étant co-productrices d'IFN γ et de TNF. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type de la moyenne avec 3 à 4 souris par groupe; FMO : fluorescence moins un; * indique P < 0,05; ** indique P < 0,01; **** indique P < 0,0001; jpi : jour(s) post-infection.

4.1.8 Le système *LysM-Cre* dans les cellules spléniques n'est pas efficace pour supprimer HIF-1α dans les cellules CD11b⁺ lors de l'infection par *L. donovani*

Nos observations précédemment publiées indiquent que l'ablation conditionnelle de HIF-1α dans les cellules CD11c⁺ engendre de meilleures réponses T et diminue la production de TNF par les cellules CD11b⁺, corrélant ainsi avec la diminution des dommages à la microarchitecture (Hammami et al., 2017). Ainsi, il est très étonnant que l'ablation de HIF-1α dans l'ensemble des cellules myéloïdes ne donne pas de résultats au moins similaires. Afin d'évaluer l'efficacité de l'ablation conditionnelle de HIF-1a dans les cellules myéloïdes de la rate, la présence d'ARNm du gène Hif1a et de protéine HIF-1α a été vérifiée. L'analyse du PCR quantitatif en temps réel des cellules CD11b⁺ isolées à partir des rates de souris infectées indique qu'il y a toujours production d'ARNm du gène Hif1a (Figure 10A). De plus, malgré le fait que les souris LysM-Cre soient fréquemment utilisées pour supprimer des gènes dans les cellules myéloïdes (Ahn et al., 2014; Clausen et al., 1999; Cramer et al., 2003; Imtiyaz et al., 2010), il est observé que l'expression de HIF-1α n'est pas abrogée par le système LysM-Cre dans les cellules CD11b⁺ de la rate puisqu'il y a toujours présence de protéine avec l'immunobuvardage de type Western (Figure 10B). Finalement, les résultats indiguent qu'il y a toujours expression d'ARNm *Hif1a* et synthèse de la protéine HIF-1 α .



Figure 10: le système *LysM*-Cre n'est pas efficace pour supprimer HIF-1α dans les cellules spléniques CD11b⁺ lors de l'infection par *L. donovani*

Des souris *Hif1a*^{flox/flox} et *Hif1a*^{flox/flox} *LysM-Cre*⁺ ont été infectées avec des amastigotes *L. donovani* et aux jours 7, 14, 21 et 28 pi une purification par MACS des cellules CD11b⁺ des rates a été effectuée. A) représente la quantité d'ARNm Hif1A évaluée par PCR quantitatif en temps réel. B) représente l'immunobuvardage de type Western pour évaluer la quantité de protéines HIF-1α présente dans les cellules CD11b⁺. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type de la moyenne avec 3 à 4 souris par groupe ; jpi : jour(s) post-infection ; pi : post-infection.

4.2 Essaie d'une thérapie contre *L. donovani*

Il a été publié que HIF-1 α est nécessaire à la survie intracellulaire de *L. donovani* dans les macrophages (Singh *et al.*, 2012) et de manière générale, il semble que l'accumulation de HIF-1 α soit nuisible à la réponse immunitaire contre le parasite (Hammami *et al.*, 2017; Hammami *et al.*, 2018; Hammami *et al.*, 2015). Basée sur ces faits, l'hypothèse de la deuxième partie de ce projet de maîtrise est qu'une thérapie qui permet de réduire HIF-1 α durant la phase chronique de la LV expérimentale permettrait de diminuer l'inflammation et la charge parasitaire splénique. De ce fait, l'objectif est d'effectuer une thérapie pour diminuer HIF-1 α et de déterminer s'il y a amélioration des réponses immunologiques contre la LV expérimentale. Pour cela, la digoxine a été choisie car ce glycoside cardiaque, généralement utilisé en cas de défaillance cardiaque, est aussi un inhibiteur de la protéine HIF-1 α (Zhang *et al.*, 2008). En effet, l'administration de digoxine comme inhibiteur de la synthèse protéique de HIF-1 α semble permettre

l'augmentation de la latence et la diminution de la croissance de tumeurs xénografes. Un traitement à la digoxine des tumeurs déjà établies permet l'arrêt de croissance en une semaine (Zhang *et al.*, 2008). Ainsi, pour notre thérapie, la digoxine a été donnée quotidiennement aux souris pendant deux semaines et a été administrée à partir du jour 21 pi, car l'animal est alors en phase chronique de l'infection, c.-à-d. au moment où la charge parasitaire est déjà importante et où il est possible d'observer des dommages à la microarchitecture splénique, mais surtout parce c'est la période représentative du moment où une personne infectée montre des symptômes, est diagnostiquée et traitée. Finalement, l'intervalle de temps choisi permet suffisamment de temps pour le développement des réponses immunitaires et la réparation des dommages tissulaires s'il y a lieu.

4.2.1 Effets biologiques d'une thérapie à la digoxine sur l'infection par *L. donovani*

Comme mentionné précédemment, notre laboratoire a publié que l'ablation conditionnelle de HIF-1α des cellules CD11c⁺ permet une diminution de la charge parasitaire lors de la LV expérimentale murine (Hammami et al., 2015). Puisque la digoxine bloque la synthèse de HIF-1α (Zhang et al., 2008), il est attendu que l'administration de ce médicament engendrera des résultats similaires à ce qui a été publié. Ainsi, les effets biologiques de la thérapie ont d'abord été évalués. Pour cela, l'hépatosplénomégalie a été mesurée aux jours 21 et 35 pi chez les souris infectées non traitées et traitées. L'analyse du poids des organes en fonction du poids des animaux chez les deux groupes de souris montre que l'administration de digoxine n'affecte pas l'hépatosplénomégalie (Figure 11A et B). Cependant, au contraire de ce qui était attendu, le décompte des amastigotes sur lames colorées au Giemsa montre une augmentation significative de la charge parasitaire dans les foies des souris traitées à la digoxine en comparaison aux souris non traitées au jour 35 pi (Figure 11C). En outre, bien que la différence de charge parasitaire soit non significative pour les empreintes de rates prélevées au jour 35 pi, les résultats montrent une tendance à être plus élevés pour les souris traitées que pour leurs congénères non traités (Figure 11D). Ceci suggère que la digoxine n'affecte peut-être pas que l'expression de HIF-1α, et que d'autres cytokines sont peut-être aussi régulées par ce traitement

(Hinshaw *et al.*, 2016; Tani *et al.*, 2017). D'un autre côté, la cellularité des rates traitées à la digoxine est significativement inférieure à celle des rates non traitées indiquant que la digoxine semble avoir effet sur le recrutement cellulaires (Figure 11**E**). Finalement, les résultats suggèrent que soit la diminution de HIF-1 α n'avantage pas la réponse immunitaire contre *L. donovani*, soit que le traitement affecte d'autres facteurs importants de l'immunité contre le parasite et ainsi nuit au bénéfice apporté par la diminution de HIF-1 α .





Des souris de type *C57Bl/6* ont été infectées avec des amastigotes *L. donovani* en intraveineuse par la queue. Au jour 21 pi, un groupe de souris est quotidiennement injecté dans le péritoine avec 2 mg/kg de digoxine. A) et B) représentent l'évaluation de l'hépatosplénomégalie aux jours 21 et 35 pi pour les souris non traitées et traitées. C) et D) représentent respectivement les LDU des foies et des rates par décompte des amastigotes observés sur empreintes colorées au Giemsa aux jours 21 et 35 pi. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type de la moyenne avec 3 à 4 souris par groupe; * indique P < 0,05; jpi : jour(s) post-infection ; pi : post-infection.

4.2.2 Evaluation de l'expression de la protéine HIF-1α et d'ARNm *Hif1a* dans les cellules spléniques des souris traitées ou non avec digoxine

Zhang et ses collaborateurs ont publié que la digoxine inhibe la synthèse protéique de HIF-1 α et non l'expression d'ARN messagers (ARNm) (Zhang *et al.*, 2008). Ainsi, un immunobuvardage de type Western a été effectué afin de vérifier que la quantité de digoxine utilisée était suffisante pour supprimer la production de protéine HIF-1 α lors de l'infection par *L. donovani*. Les résultats obtenus avec les lysats protéiques de splénocytes indiquent qu'il y a bien diminution de HIF-1 α chez les souris traitées lorsque comparés aux résultats des souris non traitées (Figure 12**A et B**). Cependant, il y a toujours présence de protéines HIF-1 α (Figure 12**A et B**). De plus, en concordance avec ce qui a été publié, l'évaluation de la quantité d'ARNm *Hif1a* par PCR quantitatif en temps réel indique que l'expression augmente avec l'infection, mais que le traitement de 2 mg/kg n'affecte effectivement pas l'expression d'ARNm (Figure 12**C**). Puisque même une réduction minime de HIF-1 α chez les souris hémizygotes (Hammami *et al.*, 2015) induit des effets, il semble plausible qu'un traitement de 2 mg/kg de digoxine régule d'autres cytokines (Hinshaw *et al.*, 2016; Tani *et al.*, 2017).



Figure 12 : évaluation de la protéine HIF-1α et d'ARNm *Hif1a* dans les cellules spléniques des souris traitées ou non avec digoxine

A) Représente l'immunobuvardage de type Western réalisé avec des lysats de protéines spléniques aux jours 0, 21 et 35 pi Chaque temps donné représente un mélange de lysat protéique de rates de 3 ou 4 souris. B) Représente la densité ajustée avec la β -actine de chaque bande de l'immunobuvardage de type Western. C) Représente l'augmentation de la quantité d'ARNm pour Hif1 α au cours de l'infection dans la totalité des cellules retrouvées dans la rate. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type de la moyenne avec 3 à 4 souris par groupe; ns signifie que la différence est non significative; * indique p< 0,05; ** indique p<0,01 ; jpi : jour(s) post-infection ; pi : post-infection.

4.2.3 Comparaison des fréquences des cellules T CD4⁺ spléniques spécifiques aux antigènes de *L. donovani* chez les souris traitées ou non avec digoxine

En situation d'hypoxie, la protéine HIF-1α est capable de restreindre les fonctions effectrices des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ (Ben-Shoshan *et al.*, 2008; Charpentier *et al.*, 2016). De plus, il a été publié que les cellules T déficientes en HIF-1α produisent de plus

hauts niveaux de cytokines IFN γ et IL-2 (Lukashev *et al.*, 2006). Cela dit, la diminution de HIF-1 α par administration de digoxine devrait permettre une augmentation de cellules T CD4⁺ exprimant de l'IFN γ et probablement des co-productrices d'IFN γ /TNF. Ainsi, les effets de la digoxine sur la réponse Th1 splénique ont été évalués. Pour cela, les fréquences des cellules T CD4⁺ spléniques spécifiques aux antigènes de *L. donovani* chez les souris infectées aux jours 21 et 35 pi ont été analysées par cytométrie en flux. À l'encontre de ce à quoi l'on s'attendait, les résultats obtenus indiquent que les fréquences de cellules T CD4⁺ productrices d'IFN γ au jour 35 pi sont similaires entre les deux groupes (Figure 13**A** et **D**). De plus, au jour 35 pi, les souris traitées ont des fréquences d'IFN γ /TNF en comparaison avec les souris non traitées (Figure 13**C et F**). Finalement, cela supporte le fait que ce traitement à la digoxine régule d'autres cytokines (Hinshaw *et al.*, 2016; Tani *et al.*, 2017).



Figure 13 : comparaison des fréquences des cellules T CD4⁺ spléniques spécifiques aux antigènes de *L. donovani* chez les souris traitées ou non avec digoxine

A) et D) représentent respectivement les graphiques d'analyse de cytométrie en flux et de pourcentages de cellules T CD4⁺ de la rate secrétant de l'IFN γ aux jours 21 et 35 pi des souris non traitées et traitées avec digoxine. B) et E) représentent respectivement les cellules T CD4⁺ de la rate secrétant du TNF. Tandis que C) et F) représentent respectivement les graphiques d'analyse de cytométrie en flux et de pourcentages de cellules T CD4⁺ de la rate étant co-productrices d'IFN γ et de TNF. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type de la moyenne avec 3 à 4 souris par groupe; * indique P < 0,05; ** indique P < 0,01; *** indique P < 0,001 ; jpi : jour(s) post-infection ; pi : post-infection.

4.2.4 Comparaison des fréquences des cellules Tr1 spléniques chez les souris traitées ou non avec la digoxine

Comme mentionné précédemment, la protéine HIF-1 α est impliqué dans la régulation de l'expression d'IL-10 (Cai *et al.*, 2013; Fecher *et al.*, 2016; Mascanfroni *et al.*, 2015) et donc influence les cellules Tr1 (Ben-Shoshan *et al.*, 2008; Charpentier *et al.*, 2016). Ainsi, la diminution de HIF-1 α par l'administration de digoxine devrait permettre une diminution des cellules T co-productrices d'IFN γ /IL-10. Cela dit, les effets de la digoxine sur les réponses Tr1 spléniques ont été évalués. Pour cela, les splénocytes des souris infectées aux jours 21 et 35 pi ont été analysés par cytométrie en flux. Encore une fois, à l'encontre de ce qui était attendu, les résultats indiquent qu'au jour 35 pi les fréquences de cellules productrices d'IL-10 (Figure 14**A** et **C**) et co-productrices d'IFN γ /IL-10 chez les souris traitées sont supérieures à celles des souris non traitées (Figure 14**B** et **D**). La raison de ces résultats est peut-être due au nombre important de parasites dans les rates (Figure 11**D**) ou peut-être que d'autres cytokines sont dérégulées par le traitement.



Figure 14 : comparaison des fréquences des cellules Tr1 spléniques chez les souris traitées ou non avec digoxine

A) et C) représentent respectivement les graphiques d'analyse de cytométrie en flux et de pourcentages des cellules T CD4⁺ de la rate produisant de l'IL-10 aux jours 21 et 35 pi des souris non traitées et traitées avec digoxine. Tandis que B et D) représentent respectivement les graphiques d'analyse de cytométrie en flux et de pourcentages de cellules T CD4⁺ de la rate étant co-productrices d'IFNy/IL-10. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type de la moyenne avec 3 à 4 souris par groupe; * indique P < 0,05; ** indique P < 0,01; jpi : jour(s) post-infection ; pi : post-infection.

4.2.5 Comparaison des fréquences des cellules T CD4⁺ hépatiques spécifiques aux antigènes de *L. donovani* chez les souris traitées ou non avec digoxine

Comme mentionné dans la revue de littérature scientifique faite dans la section 2.3.1, la protéine HIF-1α induit des réponses différentes d'un type cellulaire à l'autre et donc probablement d'un organe à l'autre. C'est pourquoi les effets de la digoxine sur les

réponses cellulaires T CD4⁺ du foie ont été évalués. Pour cela, les lymphocytes hépatiques des souris traitées ou non ont été isolés et ont été analysés par cytométrie en flux. Ainsi, l'analyse des cellules T CD4⁺ au jour 35 pi n'indique aucune différence significative des fréquences de cellules T CD4⁺ productrices d'IFNγ (Figure 15**A** et **D**), de TNF (Figure 15**B** et **E**) et d'IL-10 (Figure 15**C** et **F**). Cependant, bien qu'il n'y ait pas de différence de fréquences pour les cellules T CD4⁺ co-productrices d'IFNγ/TNF (Figure 15**G** et **I**), on voit une augmentation significative des cellules T CD4⁺ co-productrices d'IFNγ/IL-10 (Figure 15**H** et **J**). Ceci semble montrer que la digoxine aurait un effet ciblé sur la production d'IL-10. En sommes, ces résultats laissent penser que peut-être la digoxine a des effets sur d'autres éléments cellulaires (Hinshaw *et al.*, 2016; Tani *et al.*, 2017).



Figure 15 : comparaison des fréquences des cellules T CD4⁺ hépatiques spécifiques aux antigènes de *L. donovani* chez les souris traitées ou non avec digoxine

Les lymphocytes des foies de souris infectées non traitées et traitées des jours 21 et 35 pi sont isolés et stimulés avec BMDCs mis en présence d'amastigotes fixés. A) et D) représentent respectivement les graphiques d'analyse de cytométrie en flux et de pourcentages des cellules T CD4⁺ du foie produisant de l'IFN γ aux jours 21 et 35 pi des souris non traitées et traitées avec digoxine. B) et E) représentent respectivement la même chose que précédemment, mais pour les cellules T CD4⁺ du foie produisant du TNF. Tandis que C et F) représentent respectivement les graphiques d'analyse de cytométrie en flux et de pourcentages des cellules T CD4⁺ du foie étant co-productrices d'IFN γ /TNF. Les barres d'erreur représentent l'erreur-type de la moyenne avec 3 à 4 souris par groupe; * indique P < 0,05; ** indique P < 0,01.

4.2.6 Comparaison de la modification de la microarchitecture des rates des les souris traitées ou non avec digoxine lors de l'infection par *L. donovani*

Comme mentionné dans la première partie des résultats, la modification de la microarchitecture et la destruction de zone marginale splénique durant la LV est associée à la forte concentration de TNF dans le milieu (Engwerda et al., 2002). Notre laboratoire ayant déjà publié que l'absence de HIF-1α dans les cellules CD11c⁺ permet une diminution de l'expression de TNF (Hammami et al., 2015), il semble logique de penser que l'utilisation d'une thérapie pour diminuer HIF-1α permettrait de protéger la microarchitecture splénique. Ainsi, afin de vérifier si la digoxine influence cet aspect de la LV, des coupes histologiques de rate de souris infectées traitées ou non ont été comparées par microscopie confocale. Pour ce faire, un marquage avec une combinaison d'anticorps couplés à des fluorochromes a été effectué pour permettre de distinguer les cellules B (B220⁺, en vert), les cellules myéloïdes (CD11b⁺, en bleu) et les macrophages de la zone marginale (CD169⁺, en rouge) (Figure 16). Les coupes histologiques des souris non traitées montrent que du jour 0 à 35 pi, il y a hypertrophie de la rate et une importante accumulation de cellules myéloïdes (CD11b⁺). Cependant, la comparaison des rates de souris traitées et non traitées au jour 35 pi n'indique pas de différence notable ; l'accumulation de cellules myéloïdes, les follicules B et même la zone marginale semblent similaires. Ainsi, au contraire de ce qui était prévu, il semble qu'un traitement de 2 mg/kg de digoxine n'affecte ni l'accumulation de cellules myéloïdes ni la destruction de la zone marginale suggérant encore une fois que la digoxine n'a pas un effet thérapeutique.



Figure 16 : comparaison de la modification de la microarchitecture des rates des souris traitées ou non avec digoxine lors de l'infection par *L. donovani*

Des souris de type *C57Bl/6* ont été infectées avec des amastigotes *L. donovani*, après 21 jours d'infection, un groupe de 4 souris a été injecté en intrapéritonéal avec 2 mg/kg de digoxine. Des coupes histologiques de rates naïves et infectées jours 21 et 35 pi ont été mises sur lames et colorées pour les populations de cellules B (B220⁺, en vert), myéloïdes (CD11b⁺, en bleu) et macrophages de la zone marginale (CD169⁺, en rouge). Les barres d'échelle représentent 1000 µm. Grossissement 10X.

5 **DISCUSSION**

5.1 Impacts de l'ablation conditionnelle de la protéine HIF-1α des cellules myéloïdes lors de la leishmaniose viscérale

Le système d'ablation conditionnelle *LysM-Cre* a déjà été utilisé avec succès dans plusieurs publications (Ahn *et al.*, 2014; Clausen *et al.*, 1999; Cramer *et al.*, 2003; Imtiyaz *et al.*, 2010; Shepardson *et al.*, 2014). Dans ces études, ce système a été utilisé pour l'observation des cellules myéloïdes dérivées de la moelle osseuse (Clausen *et al.*, 1999; Imtiyaz *et al.*, 2010), retrouvées dans le péritoine (Cramer *et al.*, 2003) ou dans des organes comme les poumons (Shepardson *et al.*, 2014). Afin de vérifier l'hypothèse de la première partie de ce projet de maîtrise, une lignée de souris *Hif1a^{flox/flox} LysM-Cre*⁺ a été générée. L'hypothèse énonçait que l'ablation de la protéine HIF-1α dans les cellules myéloïdes permettrait de meilleures réponses immunologiques contre *L. donovani.* Ainsi, l'objectif était de définir le rôle de la protéine HIF-1α dans les réponses immunitaires induites par les cellules myéloïdes lors de la LV expérimentale. Cependant, l'hypothèse énoncée n'a pu être infirmée ou confirmée par les résultats obtenus.

L'analyse des cellules CD11b⁺ de la rate des souris *Hif1a^{flox/flox} LysM-Cre*⁺ a montré que l'ablation de HIF-1α ne se faisait pas correctement (Figure 10). Ce résultat avait été pressenti par les analyses de cytométrie en flux et des coupes histologiques faites en même temps. En effet, les résultats obtenus ont montré que, de manière générale, il n'y avait aucune différence dans le recrutement des cellules myéloïdes à la rate (Figure 5), aucune différence au niveau des réponses cellulaires spléniques T CD4⁺ (Figure 7 et Figure 8) et aucune différence dans la modification de la microarchitecture durant la phase chronique de l'infection (Figure 6). Ainsi, le modèle murin *LysM-Cre* n'est pas adéquat pour l'étude des cellules myéloïdes qui résident dans la rate. D'ailleurs, cette conclusion est soutenue par une étude publiée dans le *Journal of Immunological Methods* (Abram *et al.*, 2014). Ces chercheurs ont examiné l'efficacité des différents promoteurs associés aux cellules myéloïdes et utilisés pour la délétion conditionnelle par recombinase-Cre. Ils ont montré que les souris *LysM-Cre* ont moins de 40% des cellules CD11b⁺, des macrophages de la pulpe rouge et de la zone marginale de la rate qui

expriment la recombinase (Abram *et al.*, 2014). Cependant, notre laboratoire a montré que les monocytes sont la composante majeure des cellules myéloides qui infiltrent la rate et qu'en utilisant le système d'ablation conditionnelle *CD11c-Cre*, il est possible de supprimer HIF-1 α dans les monocytes (Abidin *et al.*, 2017; Hammami *et al.*, 2017). Ainsi, les souris *Hif1a^{flox/flox} CD11c-Cre*⁺ sont hautement résistantes à *L. donovani* (Hammami *et al.*, 2015) et montrent une augmentation de la fréquence et du nombre de monocytes inflammatoires spléniques (Hammami *et al.*, 2017). Les monocytes déficients en HIF-1 α sont plus résistants aux parasites et les cellules myéloides spléniques ont de meilleures capacités anti-leishmaniales (Hammami *et al.*, 2017). Cet ensemble de résultats supporte l'hypothèse que les monocytes et la protéine HIF-1 α jouent des rôles importants lors de la LV et qu'ils sont de bonnes cibles thérapeutiques.

La publication du Journal of Immunological Methods (Abram et al., 2014) a aussi montré que les souris de génotype LysM-Cre expriment la recombinase dans plus de 60% des neutrophiles de la moelle, plus de 70% des neutrophiles de la rate et dans environ 80% des neutrophiles du sang périphérique. Bien qu'aucune expérience n'ait été faite pour vérifier précisément l'expression de la recombinase dans les neutrophiles spléniques des souris Hif1a^{flox/flox} LysM-Cre⁺ utilisées pour le projet présenté ici, il est possible d'extrapoler et de dire que les niveaux d'expression étaient probablement similaires à ceux publiés. Ainsi, à l'avenir il faudrait confirmer l'ablation de HIF-1a dans les neutrophiles des souris Hif1a^{flox/flox} LysM-Cre⁺, car si tel est le cas HIF-1α durant la LV expérimentale ne semble pas avoir d'impact sur leur recrutement à la rate (Figure 5). Il serait aussi possible d'extrapoler davantage et de dire que l'absence de HIF-1α dans les neutrophiles n'a pas d'impact sur l'élimination des amastigotes L. donovani puisqu'aucune différence n'a été évaluée pour la charge parasitaire hépatique et splénique (Figure 4). Malgré tout, il serait intéressant de poursuivre l'analyse des neutrophiles au-delà du jour 35 pi pour confirmer réellement l'extrapolation que ce type cellulaire n'a pas d'impact sur l'élimination des amastigotes.

Cependant, si toute possibilité d'erreur de manipulations est exclue, les analyses des cellules T CD4⁺ spléniques des souris *Hif1a^{flox/flox} LysM-Cre*⁺ montraient qu'elles produisaient moins d'IL-10 au jour 21 (Figure 8). Il se pourrait que ce soit la résultante d'un petit nombre de cellules myéloïdes, incluant les neutrophiles, qui n'expriment pas la

90

protéine HIF-1α et qui aurait eu une petite incidence sur les réponses cellulaires T. En effet, on sait que HIF-1α induit l'expression d'IL-10 par les DCs CD11c⁺ spléniques (Hammami *et al.*, 2015) et que ceci promeut le développement des Tr1 exprimant de l'IL-10 (Faleiro *et al.*, 2014). Bien entendu, ces énoncés restent des extrapolations et davantage d'expérimentations seront nécessaires pour les vérifier.

5.2 Essaie d'une thérapie contre *L. donovani*

L'hypothèse de cette deuxième partie énonçait qu'une thérapie réduisant HIF-1 α durant la phase chronique de la LV expérimentale permettrait de diminuer l'inflammation et la charge parasitaire splénique. Ainsi, l'objectif de cette deuxième partie était de réduire HIF-1 α lors de la LV expérimentale par l'administration de digoxine. Cependant, l'hypothèse n'a pu être infirmée ou confirmée par les résultats obtenus dans ce projet de maitrise.

L'administration de digoxine aux souris infectées par L. donovani, bien que diminuant la quantité de protéine dans les splénocytes (Figure 12) n'a pas induit une réduction de la charge parasitaire et au contraire semblait l'augmenter (Figure 11). L'augmentation des cellules T CD4⁺ co-productrices d'IL-10 et d'IFNy dans la rate (Figure 13 et Figure 14), ainsi que la diminution des cellules T CD4⁺ spléniques co-productrices d'IFNy et de TNF (Figure 15) peuvent être liés à la diminution de HIF-1 α par l'administration de digoxine. En effet, comme mentionné dans la revue de littérature (voir section 2.3.1), il a déjà été publié que la protéine dans les cellules T agit comme un régulateur négatif pour la production de Treg et qu'ainsi son ablation engendre l'augmentation de la production de Treg (Dang *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2011). Cependant, l'inhibition de HIF-1α même partielle par la digoxine aurait dû permettre une meilleure élimination des parasites (Hammami et al., 2017; Hammami et al., 2018). Ainsi, ces résultats font plutôt penser que sans doute le traitement inhibe ou augmente d'autres éléments cellulaires (facteurs de transcription, enzymes, etc.). Cette extrapolation n'a pas été vérifiée par d'autres manipulations, mais est soutenue par la littérature scientifique. En effet, des chercheurs travaillant avec un modèle murin de colite ont publié que l'administration de digoxine chez les souris

augmente la quantité d'ARNm d'IL-10 des cellules présentes dans la lamina propria du côlon (Tani *et al.*, 2017). L'IL-10 durant la LV a une activité immunosuppressive (Stäger *et al.*, 2006), incluant l'inhibition de l'activation des macrophages (Bogdan *et al.*, 1991) et des réponses Th1 (Murphy *et al.*, 2001). Ainsi ceci pourrait expliquer les résultats obtenus par cytométrie en flux (Figure 13, Figure 14 et Figure 15) et l'augmentation de la charge parasitaire observée (Figure 11).

De plus, des publications scientifiques ont montré que l'utilisation de digoxine inhibe l'expression d'ARNm d'IL-17A, d'IL-23, et d'IFNy ainsi que le développement de cellules Th17 (Hinshaw et al., 2016; Tani et al., 2017). L'IL-17 est une cytokine qui agit sur un large éventail de cellules. Elle induit l'expression d'autres cytokines (IL-6, IL-8, GM-CSF, G-CSF), chimiokines (CXCL1, CXCL10) et métalloprotéases, en plus de jouer un rôle important dans l'activation et le recrutement des neutrophiles aux sites inflammatoires (Baeten & Kuchroo, 2013; Banerjee et al., 2016; Bettelli et al., 2007). D'autre part, il a été suggéré que l'IL-17A est importante pour une réponse protectrice durant la LV (Banerjee et al., 2016; Mallick et al., 2016; Pitta et al., 2009). En effet, il a été publié que cette cytokine agit en synergie avec l'IFNy pour activer la production de NO par les macrophages infectés (Nascimento et al., 2015; Rodrigues et al., 2016). Toutefois, le rôle de l'IL-17 durant la LV est controversé (Banerjee et al., 2016; Sheel et al., 2015; Terrazas et al., 2016) et davantage d'investigations sont nécessaires. Néanmoins, en extrapolant que durant la thérapie par digoxine celle-ci inhibait l'expression d'IL-17 ainsi que celle d'IFNy, cela implique qu'il y avait probablement des répercussions sur l'expression de NO chez les macrophages, sur le recrutement de certaines cellules immunitaires et/ou sur le développement des réponses Th1. Ainsi, cette extrapolation pourrait expliquer les résultats obtenus, c'est-à-dire l'augmentation de la charge parasitaire (Figure 11), la diminution des réponses Th1 (Figure 13) et l'augmentation des réponses Tr1 (Figure 14 et Figure 15). Bien entendu, ces énoncés restent des extrapolations et davantage d'expérimentations seront nécessaires pour les vérifier.

En fin de compte, l'utilisation de digoxine a des fins locales ou systémiques est probablement le facteur déterminant des résultats positifs ou négatifs observés lors des expérimentations contre les tumeurs (Zhang *et al.*, 2008). En effet, comme décrit en partie dans la revue de littérature, les rôles de HIF-1 α sont tellement divers et variés chez les

92

différentes populations cellulaires que son inhibition complète (systémique) engendre peut-être des réactions opposées qui annulent le traitement ou engendre des effets néfastes. Ce qui a peut-être aussi été le cas dans l'expérimentation présentée dans ce mémoire. Ainsi, il est normal d'avoir de meilleures réactions lorsque la supression de HIF-1α est ciblée localement ou de manière plus spécifique.

6 CONCLUSION

Dans un premier temps, les résultats obtenus pour la première partie de ce projet (Impacts de l'ablation conditionnelle de la protéine HIF-1α des cellules myéloïdes lors de la leishmaniose viscérale) ont montré que l'utilisation du système LysM-Cre n'était pas adéquate pour une expérience faite avec les cellules myéloïdes de la rate. Toutefois, davantage d'expérimentations auraient pu être faites avec ce modèle, car selon Abram et al., le système LysM-Cre est efficace dans les neutrophiles. À l'avenir le rôle de HIF-1a dans les cellules myéloïdes lors de la LV expérimentale murine pourrait être investigué avec un modèle d'ablation conditionnelle basé sur le promoteur du gène S100a8 (Ahn et al., 2014; Bok et al., 2017). Ce gène est associé à la protéine calgranuline A ou myeloidrelated protein-8 (MRP8) dont l'expression est détectée dans les cellules myéloïdes myéloïdes (incluant les progéniteurs communs. les progéniteurs macrophages/granulocytes, les monocytes et les granulocytes), mais pas dans les cellules hématopoïétiques (Ahn et al., 2014; Lagasse & Weissman, 1992).

Dans un second temps, les résultats obtenus pour la deuxième partie de ce projet (Essaie d'une thérapie contre *L. donovani*) ont montré que l'utilisation de digoxine comme thérapie contre *L. donovani* n'était pas adéquate car elle ne permettait pas une grande diminution de la protéine HIF-1 α dans les cellules de la rate. Cependant, les dernières publications de notre laboratoire montrent qu'une élimination de la protéine HIF-1 α dans les cellules de la rate. Cependant, les dernières publications de notre laboratoire montrent qu'une élimination de la protéine HIF-1 α dans les cellules CD11c⁺ est bénéfique à l'élimination du parasite (Hammami *et al.*, 2017; Hammami *et al.*, 2018). Ainsi, la protéine pourrait toujours être une bonne cible thérapeutique, mais il faudrait pouvoir cibler spécifiquement la population cellulaire CD11c⁺. Ce qui jusqu'à maintenant semble difficilement réalisable. En outre, d'autres moyens thérapeutiques devraient être expérimentés. À l'avenir, des tentatives de traitement pourraient être reprises en utilisant cette fois-ci un inhibiteur de l'expression de HIF-1 α plus spécifique. Il est possible d'en trouver plusieurs et ils sont déjà reportés dans la littérature (Wigerup *et al.*, 2016). Les composés PX-478 et BAY 87-2243 ont été utilisés avec succès dans plusieurs études pour inhiber HIF-1 α chez la souris (Agarwal

et al., 2016; Ellinghaus *et al.*, 2013; Helbig *et al.*, 2014; Kheshtchin *et al.*, 2016; Koh *et al.*, 2008; Schwartz *et al.*, 2010; Schwartz *et al.*, 2009; Sun *et al.*, 2013; Welsh *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2015). Ce qui indique que ces derniers pourraient être de bons candidats pour d'éventuelles investigations.

7 REFERENCES

- Abidin BM, Hammami A, Stäger S & Heinonen KM (2017) Infection-adapted emergency hematopoiesis promotes visceral leishmaniasis. *PLOS Pathogens* 13(8):e1006422.
- Abram CL, Roberge GL, Hu Y & Lowell CA (2014) Comparative analysis of the efficiency and specificity of myeloid-Cre deleting strains using ROSA-EYFP reporter mice. *J Immunol Methods* 408:89-100.
- Agarwal S, Loder S, Brownley C, Cholok D, Mangiavini L, Li J, Breuler C, Sung HH, Li S, Ranganathan K, Peterson J, Tompkins R, Herndon D, Xiao W, Jumlongras D, Olsen BR, Davis TA, Mishina Y, Schipani E & Levi B (2016) Inhibition of Hiflalpha prevents both trauma-induced and genetic heterotopic ossification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(3):E338-347.
- Ahmed S, Colmenares M, Soong L, Goldsmith-Pestana K, Munstermann L, Molina R & McMahon-Pratt D (2003) Intradermal Infection Model for Pathogenesis and Vaccine Studies of Murine Visceral Leishmaniasis. *Infect Immun* 71(1):401-410.
- Ahn GO, Seita J, Hong BJ, Kim YE, Bok S, Lee CJ, Kim KS, Lee JC, Leeper NJ, Cooke JP, Kim HJ, Kim IH, Weissman IL & Brown JM (2014) Transcriptional activation of hypoxiainducible factor-1 (HIF-1) in myeloid cells promotes angiogenesis through VEGF and S100A8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111(7):2698-2703.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K & Peter W (2011) *Biologie moléculaire de la cellule*. Médecine Sciences Publications Lavoisier, Paris, 5è édition. 1601 p
- Anand RJ, Gribar SC, Li J, Kohler JW, Branca MF, Dubowski T, Sodhi CP & Hackam DJ (2007) Hypoxia causes an increase in phagocytosis by macrophages in a HIF-1alpha-dependent manner. J Leukoc Biol 82(5):1257-1265.
- Arango Duque G & Descoteaux A (2015) Leishmania survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Curr Opin Microbiol* 26.
- Arrais-Silva WW, Paffaro VA, Jr., Yamada AT & Giorgio S (2005) Expression of hypoxiainducible factor-1alpha in the cutaneous lesions of BALB/c mice infected with Leishmania amazonensis. *Exp Mol Pathol* 78(1):49-54.
- Askenase Michael H, Han S-J, Byrd Allyson L, Morais da Fonseca D, Bouladoux N, Wilhelm C, Konkel Joanne E, Hand Timothy W, Lacerda-Queiroz N, Su X-z, Trinchieri G, Grainger John R & Belkaid Y (Bone-Marrow-Resident NK Cells Prime Monocytes for Regulatory Function during Infection. *Immunity* 42(6):1130-1142.
- Ato M, Stäger S, Engwerda CR & Kaye PM (2002) Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. *Nat Immunol* 3(12):1185-1191.
- Auffray C, Michael H. Sieweke & Geissmann F (2009) Blood Monocytes: Development, Heterogeneity, and Relationship with Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology* 27(1):669-692.

- Baeten DL & Kuchroo VK (2013) How Cytokine networks fuel inflammation: Interleukin-17 and a tale of two autoimmune diseases. *Nat Med* 19(7):824-825.
- Banerjee A, Bhattacharya P, Joshi AB, Ismail N, Dey R & Nakhasi HL (2016) Role of proinflammatory cytokine IL-17 in Leishmania pathogenesis and in protective immunity by Leishmania vaccines. *Cell Immunol* 309:37-41.
- Bankoti R & Stäger S (2012) Differential Regulation of the Immune Response in the Spleen and Liver of Mice Infected with Leishmania donovani. *Journal of tropical medicine* 2012:639304.
- 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.
- Bettelli E, Korn T & Kuchroo VK (2007) Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 19(6):652-657.
- Bhandari T, Olson J, Johnson RS & Nizet V (2013) HIF-1alpha influences myeloid cell antigen presentation and response to subcutaneous OVA vaccination. *J Mol Med (Berl)* 91(10):1199-1205.
- Bogdan C, Vodovotz Y & Nathan C (1991) Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med* 174(6):1549-1555.
- Bok S, Kim YE, Woo Y, Kim S, Kang SJ, Lee Y, Park SK, Weissman IL & Ahn GO (2017) Hypoxia-inducible factor-1α regulates microglial functions affecting neuronal survival in the acute phase of ischemic stroke in mice. *Oncotarget* 8(67):111508-111521.
- Bronte V, Brandau S, Chen S-H, Colombo MP, Frey AB, Greten TF, Mandruzzato S, Murray PJ, Ochoa A, Ostrand-Rosenberg S, Rodriguez PC, Sica A, Umansky V, Vonderheide RH & Gabrilovich DI (2016) Recommendations for myeloid-derived suppressor cell nomenclature and characterization standards. *Nature Communications* 7:12150.
- Bronte V & Pittet Mikael J (The Spleen in Local and Systemic Regulation of Immunity. *Immunity* 39(5):806-818.
- Cai Z, Luo W, Zhan H & Semenza GL (2013) Hypoxia-inducible factor 1 is required for remote ischemic preconditioning of the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(43):17462-17467.
- Carré N, Collot M, Guillard P, Horellou M & Gangneux JP (2010) Visceral leishmaniasis epidemiology, diagnosis, treatment and prophylaxis. *Journal de Pharmacie Clinique* 29(3):121-148.
- Carrion J, Nieto A, Iborra S, Iniesta V, Soto M, Folgueira C, Abanades DR, Requena JM & Alonso C (2006) Immunohistological features of visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Parasite Immunol* 28(5):173-183.
- Carroll VA & Ashcroft M (2005) Targeting the molecular basis for tumour hypoxia. *Expert Rev* Mol Med 7(6):1-16.
- Charpentier T, Hammami A & Stäger S (2016) Hypoxia inducible factor 1alpha: A critical factor for the immune response to pathogens and Leishmania. *Cell Immunol* 309:42-49.
- Clausen BE, Burkhardt C, Reith W, Renkawitz R & Forster I (1999) Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 8(4):265-277.

- Colegio OR, Chu NQ, Szabo AL, Chu T, Rhebergen AM, Jairam V, Cyrus N, Brokowski CE, Eisenbarth SC, Phillips GM, Cline GW, Phillips AJ & Medzhitov R (2014) Functional polarization of tumour-associated macrophages by tumour-derived lactic acid. *Nature* 513(7519):559-563.
- Cramer T, Yamanishi Y, Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M & Nizet V (2003) HIF-1α is essential for myeloid cell-mediated inflammation. *Cell* 112(5):645-657.
- Dang EV, Barbi J, Yang HY, Jinasena D, Yu H, Zheng Y, Bordman Z, Fu J, Kim Y, Yen HR, Luo W, Zeller K, Shimoda L, Topalian SL, Semenza GL, Dang CV, Pardoll DM & Pan F (2011) Control of T(H)17/T(reg) balance by hypoxia-inducible factor 1. *Cell* 146(5):772-784.
- 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 of Inflammation* 2016:10.
- Elia AR, Cappello P, Puppo M, Fraone T, Vanni C, Eva A, Musso T, Novelli F, Varesio L & Giovarelli M (2008) Human dendritic cells differentiated in hypoxia down-modulate antigen uptake and change their chemokine expression profile. *J Leukoc Biol* 84(6):1472-1482.
- Ellinghaus P, Heisler I, Unterschemmann K, Haerter M, Beck H, Greschat S, Ehrmann A, Summer H, Flamme I, Oehme F, Thierauch K, Michels M, Hess-Stumpp H & Ziegelbauer K (2013) BAY 87-2243, a highly potent and selective inhibitor of hypoxia-induced gene activation has antitumor activities by inhibition of mitochondrial complex I. *Cancer Med* 2(5):611-624.
- Eltzschig HK & Carmeliet P (2011) Hypoxia and Inflammation. *New England Journal of Medicine* 364(7):656-665.
- Engwerda CR, Ato M, Cotterell SE, Mynott TL, Tschannerl A, Gorak-Stolinska PM & Kaye PM (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 CR, Ato M & Kaye PM (2004a) Macrophages, pathology and parasite persistence in experimental visceral leishmaniasis. *Trends Parasitol* 20.
- Engwerda CR, Ato M, Stäger S, Alexander CE, Stanley AC & Kaye PM (2004b) Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in the control of Leishmania donovani infection. *Am J Pathol* 165.
- Faleiro RJ, Kumar R, Hafner LM & Engwerda CR (2014) Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 8.
- Faucher B & Piarroux R (2011) Visceral leishmaniasis: an update. *La Revue de medecine interne* 32(9):544-551.
- Faure E (2017) *La leishmaniose.* http://www.caducee.net/DossierSpecialises/infection/leishmaniose.asp (Consulté le 20 novembre)
- Fecher RA, Horwath MC, Friedrich D, Rupp J & Deepe GS, Jr. (2016) Inverse Correlation between IL-10 and HIF-1alpha in Macrophages Infected with Histoplasma capsulatum. *J Immunol* 197(2):565-579.

- Filippi C, Malherbe L, Julia V & Glaichenhaus N (2001) Immunity against Leishmania. *Med. Sci.* 17(11):1120-1128.
- Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA & Siqueira-Neto JL (2012) Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist* 2:11-19.
- Gaber T, Haupl T, Sandig G, Tykwinska K, Fangradt M, Tschirschmann M, Hahne M, Dziurla R, Erekul K, Lautenbach M, Kolar P, Burmester GR & Buttgereit F (2009) Adaptation of human CD4+ T cells to pathophysiological hypoxia: a transcriptome analysis. *J Rheumatol* 36(12):2655-2669.
- Gangneux J-P, Donaghy L & Marty P (2006) Place du foie dans la leishmaniose viscérale. *Gastroentérologie Clinique et Biologique* 30(8):1027-1032.
- Geissmann F, Jung S & Littman DR (2003) Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 19(1):71-82.
- Ghosh K, Sharma G, Saha A, Kar S, Das PK & Ukil A (2013) Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-helper 17 cytokines. *J Infect Dis* 207.
- Gorak PM, Engwerda CR & Kaye PM (1998) Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following Leishmania donovani infection. *Eur J Immunol* 28.
- Gothié E & Pouysségur J (2002) HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie. *Med Sci (Paris)* 18(1):70-78.
- Grimaldi G, Jr. & Tesh RB (1993) Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev* 6(3):230-250.
- Hammami A, Abidin BM, Charpentier T, Fabie A, Duguay AP, Heinonen KM & Stäger S (2017) HIF-1alpha is a key regulator in potentiating suppressor activity and limiting the microbicidal capacity of MDSC-like cells during visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog* 13(9):e1006616.
- Hammami A, Abidin BM, Heinonen KM & Stäger S (2018) HIF-1α hampers dendritic cell function and Th1 generation during chronic visceral leishmaniasis. *Sci. Rep.* 8:3500.
- Hammami A, Charpentier T, Smans M & Stäger 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.
- Hangai-Hoger N, Cabrales P, Briceno JC, Tsai AG & Intaglietta M (2004) Microlymphatic and tissue oxygen tension in the rat mesentery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286(3):H878-883.
- Hangai-Hoger N, Tsai AG, Cabrales P & Intaglietta M (2007) Terminal lymphatics: the potential "lethal corner" in the distribution of tissue pO2. *Lymphat Res Biol* 5(3):159-168.
- Helbig L, Koi L, Bruchner K, Gurtner K, Hess-Stumpp H, Unterschemmann K, Baumann M, Zips D & Yaromina A (2014) BAY 87-2243, a novel inhibitor of hypoxia-induced gene activation, improves local tumor control after fractionated irradiation in a scheduledependent manner in head and neck human xenografts. *Radiat Oncol* 9:207.
- Higashiyama M, Hokari R, Hozumi H, Kurihara C, Ueda T, Watanabe C, Tomita K, Nakamura M, Komoto S, Okada Y, Kawaguchi A, Nagao S, Suematsu M, Goda N & Miura S (2012)

HIF-1 in T cells ameliorated dextran sodium sulfate-induced murine colitis. *J Leukoc Biol* 91(6):901-909.

- Hinshaw SJ, Ogbeifun O, Wandu WS, Lyu C, Shi G, Li Y, Qian H & Gery I (2016) Digoxin Inhibits Induction of Experimental Autoimmune Uveitis in Mice, but Causes Severe Retinal Degeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 57(3):1441-1447.
- Holmquist-Mengelbier L, Fredlund E, Lofstedt T, Noguera R, Navarro S, Nilsson H, Pietras A, Vallon-Christersson J, Borg A, Gradin K, Poellinger L & Pahlman S (2006) Recruitment of HIF-1alpha and HIF-2alpha to common target genes is differentially regulated in neuroblastoma: HIF-2alpha promotes an aggressive phenotype. *Cancer Cell* 10(5):413-423.
- Imtiyaz HZ, Williams EP, Hickey MM, Patel SA, Durham AC, Yuan LJ, Hammond R, Gimotty PA, Keith B & Simon MC (2010) Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation. *J Clin Invest* 120(8):2699-2714.
- Jantsch J, Chakravortty D, Turza N, Prechtel AT, Buchholz B, Gerlach RG, Volke M, Glasner J, Warnecke C, Wiesener MS, Eckardt KU, Steinkasserer A, Hensel M & 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 IA & Stäger S (2009) B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against Leishmania donovani infections. *PLoS Pathog* 5.
- Kaye P & Scott P (2011) Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 9.
- Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R & Stäger S (2004) The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev* 201.
- Keith B, Johnson RS & Simon MC (2011) HIF1alpha and HIF2alpha: sibling rivalry in hypoxic tumour growth and progression. *Nat Rev Cancer* 12(1):9-22.
- Kheshtchin N, Arab S, Ajami M, Mirzaei R, Ashourpour M, Mousavi N, Khosravianfar N, Jadidi-Niaragh F, Namdar A, Noorbakhsh F & Hadjati J (2016) Inhibition of HIF-1alpha enhances anti-tumor effects of dendritic cell-based vaccination in a mouse model of breast cancer. *Cancer Immunol Immunother* 65(10):1159-1167.
- Koh MY, Spivak-Kroizman T, Venturini S, Welsh S, Williams RR, Kirkpatrick DL & Powis G (2008) Molecular mechanisms for the activity of PX-478, an antitumor inhibitor of the hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol Cancer Ther* 7(1):90-100.
- Kong T, Eltzschig HK, Karhausen J, Colgan SP & Shelley CS (2004) Leukocyte adhesion during hypoxia is mediated by HIF-1-dependent induction of beta2 integrin gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(28):10440-10445.
- Kraal G (1992) Cells in the marginal zone of the spleen. Int Rev Cytol 132:31-74.
- Kumar R & Nylen S (2012) Immunobiology of visceral leishmaniasis. *Frontiers in immunology* 3.
- Lagasse E & Weissman IL (1992) Mouse MRP8 and MRP14, two intracellular calcium-binding proteins associated with the development of the myeloid lineage. *Blood* 79(8):1907-1915.

- Lapierre P & Alvarez F (2007) [The liver: an organ of the immune system?]. *Med Sci (Paris)* 23(11):985-990.
- Liu L, Wei Y & Wei X (2017) The Immune Function of Ly6Chi Inflammatory Monocytes During Infection and Inflammation. *Curr Mol Med* 17(1):4-12.
- Lukashev D, Klebanov B, Kojima H, Grinberg A, Ohta A, Berenfeld L, Wenger RH, Ohta A & Sitkovsky M (2006) Cutting edge: hypoxia-inducible factor lalpha and its activationinducible short isoform I.1 negatively regulate functions of CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *J Immunol* 177(8):4962-4965.
- Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie ALJ, Rößner S, Koch F, Romani N & Schuler G (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *Journal of Immunological Methods* 223(1):77-92.
- Mallick S, Dutta A, Chaudhuri A, Mukherjee D, Dey S, Halder S, Ghosh J, Mukherjee D, Sultana SS, Biswas G, Lai TK, Patra P, Sarkar I, Chakraborty S, Saha B, Acharya K & Pal C (2016) Successful Therapy of Murine Visceral Leishmaniasis with Astrakurkurone, a Triterpene Isolated from the Mushroom Astraeus hygrometricus, Involves the Induction of Protective Cell-Mediated Immunity and TLR9. *Antimicrob Agents Chemother* 60(5):2696-2708.
- Maltezou HC (2008) Visceral leishmaniasis: advances in treatment. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 3(3):192-198.
- Mancino A, Schioppa T, Larghi P, Pasqualini F, Nebuloni M, Chen IH, Sozzani S, Austyn JM, Mantovani A & Sica A (2008) Divergent effects of hypoxia on dendritic cell functions. *Blood* 112(9):3723-3734.
- Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A & Locati M (2013) Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 229(2):176-185.
- Maroof A & Kaye PM (2008) Temporal regulation of interleukin-12p70 (IL-12p70) and IL-12related cytokines in splenic dendritic cell subsets during Leishmania donovani infection. *Infect Immun* 76.
- Martinez FO, Helming L & Gordon S (2009) Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol* 27:451-483.
- Mascanfroni ID, Takenaka MC, Yeste A, Patel B, Wu Y, Kenison JE, Siddiqui S, Basso AS, Otterbein LE, Pardoll DM, Pan F, Priel A, Clish CB, Robson SC & Quintana FJ (2015) Metabolic control of type 1 regulatory T cell differentiation by AHR and HIF1-alpha. *Nat Med* 21(6):638-646.
- Matsuzaki J, Tsuji T, Chamoto K, Takeshima T, Sendo F & Nishimura T (2003) Successful elimination of memory-type CD8+ T cell subsets by the administration of anti-Gr-1 monoclonal antibody in vivo. *Cell Immunol* 224(2):98-105.
- McFarlane E, Perez C, Charmoy M, Allenbach C, Carter KC, Alexander J & Tacchini-Cottier F (2008) Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with Leishmania donovani. *Infect Immun* 76(2):532-541.
- McNamee EN, Johnson DK, Homann D & Clambey ET (2013) Hypoxia and hypoxia-inducible factors as regulators of T cell development, differentiation, and function. *Immunol Res* 55(0):58-70.
- Mebius RE & Kraal G (2005) Structure and function of the spleen. Nat Rev Immunol 5.

- Moradin N & Descoteaux A (2012) Leishmania promastigotes: building a safe niche within macrophages. *Front Cell Infect Microbiol* 2.
- Mougneau E, Bihl F & Glaichenhaus N (2011) Cell biology and immunology of Leishmania. *Immunol Rev* 240(1):286-296.
- Mukhopadhyay D, Mukherjee S, Roy S, Dalton JE, Kundu S, Sarkar A, Das NK, Kaye PM & Chatterjee M (2015) M2 Polarization of Monocytes-Macrophages Is a Hallmark of Indian Post Kala-Azar Dermal Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 9(10).
- Müller I & Kropf P (2012) Kinetoplastids: Leishmania. *Immunity to Parasitic Infection*, John Wiley & Sons, Ltd, 10.1002/9781118393321.ch7. p 153-164.
- Murphy ML, Wille U, Villegas EN, Hunter CA & Farrell JP (2001) IL-10 mediates susceptibility to Leishmania donovani infection. *Eur J Immunol* 31.
- Murray HW (1997) Endogenous interleukin-12 regulates acquired resistance in experimental visceral leishmaniasis. *J Infect Dis* 175.
- Murray HW, Jungbluth A, Ritter E, Montelibano C & Marino MW (2000) Visceral leishmaniasis in mice devoid of tumor necrosis factor and response to treatment. *Infect Immun* 68.
- Murray HW, Lu CM, Mauze S, Freeman S, Moreira AL, Kaplan G & Coffman RL (2002) Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infect Immun* 70(11):6284-6293.
- Murray HW, Squires KE, Miralles CD, Stoeckle MY, Granger AM & Granelli-Piperno A (1992) Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial versus established immunity. *J Immunol* 148.
- Nakano H, Yanagita M & Gunn MD (2001) CD11c(+)B220(+)Gr-1(+) cells in mouse lymph nodes and spleen display characteristics of plasmacytoid dendritic cells. *J Exp Med* 194(8):1171-1178.
- 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-1α and lipopolysaccharide. J. Cell. Physiol. 227(2):587-595.
- Nascimento MS, Carregaro V, Lima-Junior DS, Costa DL, Ryffel B & Duthie MS (2015) Interleukin 17A acts synergistically with interferon gamma to promote protection against Leishmania infantum infection. *J Infect Dis* 211.
- Nylen S & Sacks D (2007) Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol* 28.
- Oda T, Hirota K, Nishi K, Takabuchi S, Oda S, Yamada H, Arai T, Fukuda K, Kita T, Adachi T, Semenza GL & Nohara R (2006) Activation of hypoxia-inducible factor 1 during macrophage differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol* 291(1):C104-113.
- Ohhashi T, Mizuno R, Ikomi F & Kawai Y (2005) Current topics of physiology and pharmacology in the lymphatic system. *Pharmacol Ther* 105(2):165-188.
- Olivier M, Atayde VD, Isnard A, Hassani K & Shio MT (2012) Leishmania virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 14.

- Ott A (1987) Inflammation and transcutaneous measurement of oxygen pressure in dermatology. *Adv Exp Med Biol* 220:79-82.
- Owens BM, Beattie L, Moore JW, Brown N, Mann JL & Dalton JE (2012) IL-10-producing Th1 cells and disease progression are regulated by distinct CD11c(+) cell populations during visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog* 8.
- Palazon A, Goldrath A, Nizet V & Johnson RS (2014) HIF Transcription Factors, Inflammation, and Immunity. *Immunity* 41(4):518-528.
- Paun A, Bankoti R, Joshi T, Pitha PM & Stäger S (2011) Critical Role of IRF-5 in the Development of T helper 1 responses to Leishmania donovani infection. *PLOS Pathogens* 7(1):e1001246.
- Peter K (2018) *Cre/ lox Breeding for Dummies*. <u>https://www.jax.org/news-and-insights/jax-blog/2011/september/cre-lox-breeding-for-dummies</u> (Consulté le January 25)
- Peyssonnaux C, Datta V, Cramer T, Doedens A, Theodorakis EA, Gallo RL, Hurtado-Ziola N, Nizet V & Johnson RS (2005) HIF-1alpha expression regulates the bactericidal capacity of phagocytes. J Clin Invest 115(7):1806-1815.
- Pitta MG, Romano A, Cabantous S, Henri S, Hammad A & Kouriba B (2009) IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by Leishmania donovani. *J Clin Invest* 119.
- Podinovskaia M & Descoteaux A (2015) Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future Microbiol* 10(1):111-129.
- Qu X, Yang MX, Kong BH, Qi L, Lam QL, Yan S, Li P, Zhang M & Lu L (2005) Hypoxia inhibits the migratory capacity of human monocyte-derived dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 83(6):668-673.
- Resende M, Moreira D, Augusto J, Cunha J, Neves B & Cruz MT (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.
- Ribeiro-Gomes FL & Sacks D (2012) The influence of early neutrophil-Leishmania interactions on the host immune response to infection. *Front Cell Infect Microbiol* 2.
- Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Silvestre R & Estaquier J (2016) Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. *Parasites & Vectors* 9(1):118.
- Sacks DL & Melby PC (2001) Animal models for the analysis of immune responses to leishmaniasis. *Curr Protoc Immunol* Chapter 19:Unit 19 12.
- Salceda S & Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272(36):22642-22647.
- Sawyer RG, Spengler MD, Adams RB & Pruett TL (1991) The peritoneal environment during infection. The effect of monomicrobial and polymicrobial bacteria on pO2 and pH. *Ann Surg* 213(3):253-260.
- Scharton-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G & Scott P (1995) IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol* 154(10):5320-5330.

- Scholz CC & Taylor CT (2013) Targeting the HIF pathway in inflammation and immunity. *Curr Opin Pharmacol* 13(4):646-653.
- Schwartz DL, Bankson JA, Lemos R, Jr., Lai SY, Thittai AK, He Y, Hostetter G, Demeure MJ, Von Hoff DD & Powis G (2010) Radiosensitization and stromal imaging response correlates for the HIF-1 inhibitor PX-478 given with or without chemotherapy in pancreatic cancer. *Mol Cancer Ther* 9(7):2057-2067.
- Schwartz DL, Powis G, Thitai-Kumar A, He Y, Bankson J, Williams R, Lemos R, Oh J, Volgin A, Soghomonyan S, Nishii R, Alauddin M, Mukhopadhay U, Peng Z, Bornmann W & Gelovani J (2009) The selective hypoxia inducible factor-1 inhibitor PX-478 provides in vivo radiosensitization through tumor stromal effects. *Mol Cancer Ther* 8(4):947-958.
- Semenza GL (2012a) Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Cell 148(3):399-408.
- Semenza GL (2012b) Hypoxia-inducible factors: mediators of cancer progression and targets for cancer therapy. *Trends Pharmacol Sci* 33(4):207-214.
- Semenza GL, Jiang BH, Leung SW, Passantino R, Concordet JP, Maire P & Giallongo A (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(51):32529-32537.
- Serbina NV, Jia T, Hohl TM & Pamer EG (2008) Monocyte-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol* 26:421-452.
- Sheel M, Beattie L, Frame TC, de Labastida Rivera F, Faleiro RJ, Bunn PT, Montes de Oca M, Edwards CL, Ng SS, Kumar R, Amante FH, Best SE, McColl SR, Varelias A, Kuns RD, MacDonald KP, Smyth MJ, Haque A, Hill GR & Engwerda CR (2015) IL-17A-Producing gammadelta T Cells Suppress Early Control of Parasite Growth by Monocytes in the Liver. *J Immunol* 195(12):5707-5717.
- Shepardson KM, Jhingran A, Caffrey A, Obar JJ, Suratt BT, Berwin BL, Hohl TM & Cramer RA (2014) Myeloid Derived Hypoxia Inducible Factor 1-alpha Is Required for Protection against Pulmonary Aspergillus fumigatus Infection. *PLoS Pathog* 10(9).
- Shi LZ, Wang R, Huang G, Vogel P, Neale G, Green DR & Chi H (2011) HIF1alpha-dependent glycolytic pathway orchestrates a metabolic checkpoint for the differentiation of TH17 and Treg cells. *J Exp Med* 208(7):1367-1376.
- Shio MT, Hassani K, Isnard A, Ralph B, Contreras I, Gomez MA, Abu-Dayyeh I & Olivier M (2012) Host cell signalling and leishmania mechanisms of evasion. *Journal of tropical medicine* 2012:819512.
- Silver IA (1975) Measurement of pH and ionic composition of pericellular sites. *Philos Trans R* Soc Lond B Biol Sci 271(912):261-272.
- 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(6):e38489.
- Smelt SC, Engwerda CR, McCrossen M & Kaye PM (1997) Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. *J Immunol* 158(8):3813-3821.
- Soong L (2008) Modulation of Dendritic Cell Function by Leishmania Parasites. *J Immunol* 180(7):4355-4360.

- Squires KE, Schreiber RD, McElrath MJ, Rubin BY, Anderson SL & Murray HW (1989) Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN-gamma in host defense and tissue granulomatous response. *J Immunol* 143.
- Stäger S, Joshi T & Bankoti R (2010) Immune evasive mechanisms contributing to persistent Leishmania donovani infection. *Immunol Res* 47(1-3):14-24.
- Stäger S, Maroof A, Zubairi S, Sanos SL, Kopf M & Kaye PM (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.
- Stanley AC & Engwerda CR (2007) Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. *Immunol Cell Biol* 85.
- Sun K, Halberg N, Khan M, Magalang UJ & Scherer PE (2013) Selective inhibition of hypoxiainducible factor 1alpha ameliorates adipose tissue dysfunction. *Molecular and cellular biology* 33(5):904-917.
- Svensson M, Zubairi S, Maroof A, Kazi F, Taniguchi M & Kaye PM (2005) Invariant NKT cells are essential for the regulation of hepatic CXCL10 gene expression during Leishmania donovani infection. *Infect Immun* 73.
- Tani S, Takano R, Tamura S, Oishi S, Iwaizumi M, Hamaya Y, Takagaki K, Nagata T, Seto S, Horii T, Kosugi I, Iwashita T, Osawa S, Furuta T, Miyajima H & Sugimoto K (2017) Digoxin Attenuates Murine Experimental Colitis by Downregulating Th17-related Cytokines. *Inflamm Bowel Dis* 23(5):728-738.
- Taylor AP & Murray HW (1997) Intracellular antimicrobial activity in the absence of interferongamma: effect of interleukin-12 in experimental visceral leishmaniasis in interferongamma gene-disrupted mice. *J Exp Med* 185(7):1231-1239.
- Tejle K, Lindroth M, Magnusson K-E & Rasmusson B (2008) Wild-type Leishmania donovani promastigotes block maturation, increase integrin expression and inhibit detachment of human monocyte-derived dendritic cells the influence of phosphoglycans. *FEMS Microbiology Letters* 279(1):92-102.
- Tepper RI, Coffman RL & Leder P (1992) An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science* 257(5069):548-551.
- Terrazas C, Varikuti S, Kimble J, Moretti E, Boyaka PN & Satoskar AR (2016) IL-17A promotes susceptibility during experimental visceral leishmaniasis caused by Leishmania donovani. *FASEB J* 30(3):1135-1143.
- Terrazas C, Varikuti S, Oghumu S, Steinkamp HM, Ardic N, Kimble J, Nakhasi H & Satoskar AR (2017) Ly6Chi inflammatory monocytes promote susceptibility to Leishmania donovani infection. *Sci. Rep.* 7(1):14693.
- Trinchieri G (2007) Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. J Exp Med 204(2):239-243.
- Vignali DA & Kuchroo VK (2012) IL-12 family cytokines: immunological playmakers. *Nat Immunol* 13.
- Walmsley SR, Cadwallader KA & Chilvers ER (2005) The role of HIF-1alpha in myeloid cell inflammation. *Trends Immunol* 26(8):434-439.

- Warnecke C, Weidemann A, Volke M, Schietke R, Wu X, Knaup KX, Hackenbeck T, Bernhardt W, Willam C, Eckardt KU & Wiesener MS (2008) The specific contribution of hypoxiainducible factor-2alpha to hypoxic gene expression in vitro is limited and modulated by cell type-specific and exogenous factors. *Experimental cell research* 314(10):2016-2027.
- Welsh S, Williams R, Kirkpatrick L, Paine-Murrieta G & Powis G (2004) Antitumor activity and pharmacodynamic properties of PX-478, an inhibitor of hypoxia-inducible factor-1alpha. *Mol Cancer Ther* 3(3):233-244.
- Wenger RH, Stiehl DP & Camenisch G (2005) Integration of oxygen signaling at the consensus HRE. *Sci STKE* 2005(306):re12.
- Werno C, Menrad H, Weigert A, Dehne N, Goerdt S, Schledzewski K, Kzhyshkowska J & Brune B (2010) Knockout of HIF-1alpha in tumor-associated macrophages enhances M2 polarization and attenuates their pro-angiogenic responses. *Carcinogenesis* 31(10):1863-1872.
- Wigerup C, Pahlman S & Bexell D (2016) Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer. *Pharmacol Ther* 164:152-169.
- WorldHealthOrganisation(2017)Leishmaniose.http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/fr/(Consulté le 20 novembre)
- Zhang H, Qian DZ, Tan YS, Lee K, Gao P, Ren YR, Rey S, Hammers H, Chang D, Pili R, Dang CV, Liu JO & Semenza GL (2008) Digoxin and other cardiac glycosides inhibit HIF-1alpha synthesis and block tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 105(50):19579-19586.
- Zhao T, Ren H, Jia L, Chen J, Xin W, Yan F, Li J, Wang X, Gao S, Qian D, Huang C & Hao J (2015) Inhibition of HIF-1α by PX-478 enhances the anti-tumor effect of gemcitabine by inducing immunogenic cell death in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncotarget* 6(4):2250-2262.
- Zhao W, Darmanin S, Fu Q, Chen J, Cui H, Wang J, Okada F, Hamada J, Hattori Y, Kondo T, Hamuro J, Asaka M & Kobayashi M (2005) Hypoxia suppresses the production of matrix metalloproteinases and the migration of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 35(12):3468-3477.
- Zhu J, Yamane H & Paul WE (2010) Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* 28.
ANNEXE I

PLoS Pathog, 2015 Jun 5;11(6):e1004938. doi: 10.1371/journal.ppat.1004938. eCollection 2015 Jun.

IRF-5-Mediated Inflammation Limits CD8+ T Cell Expansion by Inducing HIF-1α and Impairing Dendritic Cell Functions during Leishmania Infection.

Hammami A¹, Charpentier T¹, Smans M¹, Stäger S¹.

Author information

Abstract

Inflammation is known to be necessary for promoting, sustaining, and tuning CD8+ T cell responses. Following experimental Leishmania 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+ T cell responses during L. donovani infection. Our data demonstrate that the inflammatory response induced by IRF-5 limits CD8+ T cell expansion and induces HIF-1a in dendritic cells. Ablation of HIF-1a in CD11c+ cells resulted into a higher frequency of short-lived effector cells (SLEC), enhanced CD8+ T cell expansion, and increased IL-12 expression by splenic DCs. Moreover, mice with a targeted depletion of HIF-1a in CD11c+ cells had a significantly lower splenic parasite burden, suggesting that induction of HIF-1a may represent an immune evasive mechanism adopted by Leishmania parasites to establish persistent infections.

PMID: 26046638 PMCID: PMC4457842 DOI: 10.1371/journal.ppat.1004938

ANNEXE II

Cell Rep. 2016 Jun 14;15(11):2427-37. doi: 10.1016/j.celrep.2016.05.028. Epub 2016 Jun 2.

Innate Immune B Cell Activation by Leishmania donovani Exacerbates Disease and Mediates Hypergammaglobulinemia.

Silva-Barrios S¹, Smans M¹, Duerr CU², Qureshi ST³, Fritz JH², Descoteaux A¹, Stäger S⁴.

Author information

Abstract

Participation of B cells in the immune response by various antibody-independent mechanisms has recently been uncovered. B cells producing cytokines have been described for several infections and appear to regulate the adaptive immune response. B cell activation by Leishmania donovani results in disease exacerbation. How Leishmania activates B cells is still unknown. We show that L. donovani amastigotes activate B cells by triggering endosomal TLRs; this activation leads to the induction of various cytokines. Cytokine expression is completely abrogated in B cells from Ifnar(-/-) mice upon exposure to L. donovani, suggesting an involvement of IFN-I in a positive feedback loop. IFN-I also appears to enhance the expression of endosomal TLRs following exposure to L. donovani. Cell-specific ablation of endosomal TLR signaling in B cells revealed that innate B cell activation by L. donovani is responsible for disease exacerbation through IL-10 and IFN-I production and for the promotion of hypergammaglobulinemia.

PMID: 27264176 DOI: 10.1016/j.celrep.2016.05.028