

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

LA NEUTRALISATION DU FACTEUR D'INHIBITION DE MIGRATION DES
MACROPHAGES (MIF) AUGMENTE LA SÉCRÉTION DU TNF- α ET MODULE LA
SÉCRÉTION D'IFN- γ DURANT L'INFECTION PAR *PLASMODIUM CHABAUDI*
ADAMI.

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

BENOÎT BÉLANGER

OCTOBRE 2008

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier dans un premier temps ma directrice de recherche, la Dre Tatiana Scorza (professeure au département des sciences biologiques de l'UQAM), pour ses conseils et son soutien tout au long de ma maîtrise et durant la rédaction de ce mémoire. Je tiens à remercier aussi mes collègues de laboratoire, Mathieu Cambos, Stéfany Bazinet et Jorge Cuevas pour leur aide et pour les nombreuses discussions que nous avons sur mon projet. Je voudrais remercier tous les stagiaires qui m'ont aidé durant ma maîtrise, mais particulièrement Julien Calvez et Guillaume Médina.

Je tiens à remercier mes parents, Pierre et Louise, ainsi que mon frère Christian qui ont toujours été présents pour m'encourager et me soutenir au courant de mes études. Je voudrais faire des remerciements aux techniciens du département de sciences biologiques pour leur soutien technique lors des difficultés rencontrées.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	vi
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	vii
LISTE DES SYMBOLES	x
RÉSUMÉ	xi
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I.....	3
1.1 LE PARASITE.....	4
1.1.1 <i>Le cycle de vie de Plasmodium</i>	4
1.1.2 <i>Modèle de laboratoire</i>	5
1.1.3 <i>Plasmodium chabaudi adami</i>	6
1.2 ÉRYTHROPOÏÈSE.....	7
1.3 ANÉMIE	10
1.3.1 <i>Causes et mécanismes de l'anémie hémolytique</i>	11
1.4 CELLULES NK (TUEUSES NATURELLES).....	13
1.4.1 <i>Développement des cellules NK</i>	15
1.4.2 <i>Rôles des cellules NK dans le paludisme</i>	16
1.4.3 <i>Cellules NK et MIF</i>	18
1.5 FACTEUR D'INHIBITION DE MIGRATION DES MACROPHAGES (MIF).....	18
1.5.1 <i>Mode d'action de MIF</i>	20
1.5.2 <i>MIF et le paludisme</i>	21
1.6 RÉCEPTEUR DU TYPE TOLL (TLR)	23
1.6.1 <i>MIF et TLR</i>	24
CHAPITRE II.....	26
2.1 SOURIS, PARASITES ET INFECTION	26
2.2 PURIFICATION D'ANTICORPS ET NEUTRALISATION DU MIF <i>IN VIVO</i>	26
2.3 PRÉLÈVEMENT DES ORGANES ET ISOLEMENT CELLULAIRE.....	27
2.3.1 <i>Prélèvement des cellules de la moelle osseuse</i>	27
2.3.2 <i>Prélèvement des cellules de la rate</i>	27
2.4 PURIFICATION CELLULAIRE.....	28
2.6 DÉTERMINATION DE LA CONCENTRATION D'HÉMOGLOBINE.....	29
2.7 COMPTE DES RÉTICULOCYTES.....	29
2.8 DOSAGE DE LA PRODUCTION D'IFN- γ , DE TNF- α ET IL-10	29

2.10	CYTOMÉTRIE EN FLUX	30
2.11	TEST D'INHIBITION DE MIGRATION	31
2.12	ANALYSES STATISTIQUES	31
CHAPITRE III		33
3.1	SÉCRÉTION DE MIF LORS DE L'INFECTION PAR <i>PLASMODIUM CHABAUDI ADAMI</i>	33
3.2	LA NEUTRALISATION DE MIF <i>IN VIVO</i> AMÈNE À UNE DIMINUTION DU PIC DE PARASITÉMIE LORS DE L'INFECTION PAR <i>PLASMODIUM CHABAUDI ADAMI</i>	35
3.3	LE MIF RÉGULE L'ANÉMIE ET L'ÉRYTHROPOÏÈSE LORS DE L'INFECTION PAR <i>PLASMODIUM CHABAUDI ADAMI</i> DK.	38
3.4	EFFET DU TRAITEMENT AVEC L'ANTI-MIF SUR LES CYTOKINES INFLAMMATOIRES	41
3.4.1	<i>La neutralisation de MIF in vivo varie les niveaux de production de l'IFN-γ et d'IL-10 lors de l'infection.</i>	41
3.4.2	<i>La neutralisation du MIF in vivo augmente la sécrétion de TNF-α durant l'infection</i>	42
3.4.3	<i>Effet de la neutralisation du MIF sécrété sur la production d'IFN-γ et de TNF-α sur différents types cellulaires, et ce, à différent temps de l'infection.</i>	45
3.5	EFFET D'UN PRÉTRAITEMENT AVEC DE L'HZ SUR LA PARASITÉMIE ET LA RÉTICULOCYTOSE LORS D'UNE INFECTION PAR <i>P. C. ADAMI</i> DK	49
3.5.1	<i>Augmentation de la sécrétion de MIF lors d'un prétraitement avec l'Hz succédé d'une infection avec Plasmodium chabaudi adami DK.</i>	49
3.5.2	<i>Effet d'une augmentation de la sécrétion du MIF sur la parasitémie et la réticulocytose lors d'une infection.</i>	49
CHAPITRE IV		52
RÉFÉRENCES		60

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1,1 Progression de la parasitémie en fonction du temps.....	7
1,2 Illustration des différents précurseurs érythropoïétiques.....	9
1,3 Marqueurs phénotypiques caractérisant le développement des cellules NK.....	16
3,1 La sécrétion de MIF est prononcée durant les infections par <i>P.c. adami</i> est en corrélation avec la parasitémie.....	34
3,2 La neutralisation du MIF réduit la parasitémie lors de l'infection par <i>Plasmodium chabaudi adami</i>	36
3,3 Le test de migration permet de confirmer que le potentiel neutralisateur de l'anti-MIF.....	37
3,4 La neutralisation du MIF entraîne une diminution de la réticulocytose et une augmentation de la concentration d'Hb sanguine.....	40
3,5 La neutralisation du MIF change le profil de sécrétion d'IFN- γ et d'IL-10.	43
3,6 La sécrétion de TNF- α augmente chez les souris traitées par l'anti-MIF et infectées avec <i>Plasmodium chabaudi adami</i> DK.....	44
3,7 Effet de la neutralisation du MIF exogène sur la production d'IFN- γ chez différents types cellulaires, en début et au pic d'infection.....	47
3,8 Effet de la neutralisation du MIF exogène sur la production de TNF- α par différents types cellulaires, en début et au pic d'infection.....	48
3,9 Le prétraitement avec de l'hémozoïne augmente la sécrétion de MIF ainsi que la parasitémie et inhibe la réticulocytose lors de l'infection par <i>Plasmodium chabaudi adami</i> DK	51

LISTE DES TABLEAUX

Tableau		Page
I	Espèces de <i>Plasmodium</i> murin principalement utilisées en recherche.....	6
II	Principaux marqueurs de surfaces exprimés par les précurseurs érythropoïétiques chez les souris.....	10

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AP-1	Protéine activatrice 1
BFU-E	Burst-forming-unit-erythroid
CD	Marqueur de surface cellulaire (Cluster of differentiation)
CFU-E	Colony-forming-unit-erythroid
CFU-GEMM	Cellules souches myéloïdes
CFU-GM	Colony-forming unit-granulocyte and macrophage
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
COX II	Cyclooxygénase II
cPLA ₂	Phospholipase A ₂ cytoplasmique
CR1 ou 55	Protéine régulatrice du complément 1 ou 55
CSN5	COP9 signalosome sous-unité 5
EP	Érythrocyte parasité
EPO	Érythropoïétine
EPOR	Récepteur de l'érythropoïétine
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
FBS	Sérum de bœuf fœtal
FITC	Isothiocyanate fluorescent
G6PD	Glucose-6-phosphate déshydrogénase
G-CSF	Facteur de stimulation de colonie des granulocytes
GM-CSF	Facteur de stimulation de colonie des granulocytes et des macrophages

GPI	Protéine de liaison au GTP-1
GPI	Glycophosphatidylinositol
GR	Globule rouge
Hb	Hémoglobine
H _z	Hémozoïne
IgG1	Immunoglobuline G1
IGF-1	Facteur de croissance de l'insuline 1
IFN	Interféron
IL	Interleukine
i.p.	Intrapéritonéale
i.v.	Intraveineuse
Jab-1	Protéine activatrice de la liaison a JUN
K ⁺	Ion potassium
KIR	Killer-cell immunoglobulin-like receptors
LDH	Lactate déshydrogénase
LIF	Facteur d'inhibition de leucémie
LPS	Lipopolysaccharide
M-CSF	Facteur de stimulation de colonie de macrophages
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MIF	Facteur d'inhibition de la migration des macrophages
MIFr	Facteur d'inhibition de la migration des macrophages recombinant
MIF KO	Souris déficiente en MIF
Na ⁺	Ion sodium
NK	Natural killer ou tueuse naturelle

NO	Oxyde nitrique
P.	<i>Plasmodium</i>
PAGE	Gel d'électrophorèse en polyacrylamide
PE	Phycoérythrine
PGE	Prostaglandine E
PI	Iodure de propidium
pNK	Précurseurs des cellules NK
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCF	Facteur de croissance des cellules souches
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SIDA	Syndrome de l'immunodéficience humaine
T _H	Lymphocyte T auxiliaire
TLR	Récepteur de type TOLL
TGF	Facteur de croissance tumoral
TNF	Facteur de nécrose tumoral

LISTE DES SYMBOLES

α	alpha
β	bêta
γ	gamma
μ	micro
n	nano
p	pico
Da	Dalton
g	gramme
k	kilo
kDa	kilodalton
m	mètre
mL	millilitre
SEM	Erreur standard à la moyenne

RÉSUMÉ

Le paludisme, une maladie inflammatoire, est caractérisé par une production du facteur de nécrose tumoral (TNF)- α , du facteur d'inhibition de migration des macrophages (MIF) et d'interféron (IFN)- γ , qui inhibent les précurseurs érythropoïétiques de la moelle osseuse. Dans ce contexte, le MIF est sécrété durant les infections par *Plasmodium*, et sa synergie avec l'IFN- γ et le TNF- α contribue à inhiber la différenciation érythropoïétiques et la production d'hémoglobine (Hb). Cet travail à démontrer que la neutralisation *in vivo* du MIF avec un anticorps monoclonal durant l'infection par *Plasmodium chabaudi adami DK* amène à une diminution du pic de la parasitémie et de façon inattendue à une production accrue de TNF- α en début d'infection et au pic d'infection. La neutralisation du MIF altère la production d'IFN- γ et l'IL-10 durant l'infection. Au moment où la parasitémie est faible, une diminution significative de la production d'IFN- γ , accompagnée par une chute importante de l'IL-10, est observée dans la rate de souris infectées et traitées avec l'anti-MIF. Par contre, au pic de l'infection, la production de l'IFN- γ et l'IL-10 augmente chez les souris traitées avec l'anti-MIF. En plus de ces effets inhibiteurs au pic de l'infection, la neutralisation du MIF entraîne une diminution du pourcentage de réticulocytes en circulation en début d'infection et cet effet est accompagné par une légère diminution des érythrocytes basophiliques (EryA) dans la rate. La concentration d'hémoglobine sanguine était plus élevée chez les souris traitées avec l'anticorps anti-MIF, et ce, au pic de l'infection, ce qui suggère que la neutralisation du MIF, par son effet sur la parasitémie, diminue la destruction des érythrocytes par le parasite.

Mots clés : Paludisme, hémoglobine, cytokine inflammatoire, MIF, parasitémie

INTRODUCTION

Le paludisme, avec le syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA) et la tuberculose, est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité induites par un agent infectieux chez l'homme, causant plus de 300 millions de cas cliniques et d'un à trois millions de morts chaque année (Lamb et al., 2006; WHO, 2006c). De nos jours, près de 40 % de la population mondiale, tout particulièrement celle vivant dans les pays pauvres, est à risque d'avoir le paludisme. De plus, 90 % des morts dus au paludisme se retrouvent en Afrique du Sud et au Sahara, où un enfant meurt toutes les 30 secondes (Lamb et al., 2006; WHO, 2006c). Le paludisme a des répercussions économiques importantes et l'on considère que cette maladie est l'un des obstacles majeurs à la progression économique et sociale de l'Afrique (WHO, 2006c). Il a été estimé que le paludisme engendre des coûts à l'Afrique de près de 12 milliards par année en produit international brut, ce qui suffirait amplement à maîtriser cette infection (WHO, 2006b).

Le paludisme, causé entre autres par *Plasmodium falciparum*, entraîne la mort par deux mécanismes : le premier mécanisme consiste en une anémie sévère qui conduit à une hypoxie et à une défaillance cardiaque, le deuxième mécanisme est une forme cérébrale de la maladie caractérisée par le coma et des convulsions provoquées, en partie, par la séquestration des érythrocytes dans le cerveau (Clark et al., 2006; WHO, 2006b). L'anémie sévère cause entre 200 000 et 1 million de mort à chaque année, le reste des décès étant attribué à la forme cérébrale de la maladie (WHO, 2006b). L'anémie sévère n'est pas la forme la plus fréquente d'infection induite par *Plasmodium falciparum*, mais chez les enfants de 2 ans et moins, c'est cette forme qui cause le plus de décès (Fernandes et al., 2008). La pathophysiologie du paludisme cérébral a été très étudiée, mais celle responsable de l'anémie sévère commence seulement à l'être (Menendez et al., 2000). L'anémie est caractérisée par une diminution du nombre d'érythrocytes, du volume érythrocytaire et de la concentration d'hémoglobine (Hb) circulant dans le sang (WHO, 2006a). Dans notre laboratoire, nous sommes intéressés à identifier des facteurs associés à la virulence des parasites *Plasmodium* qui influencent la réponse immunitaire innée et altèrent l'érythropoïèse en favorisant l'anémie. L'induction de l'anémie implique deux mécanismes : le premier consiste en l'augmentation de la destruction

des érythrocytes et, le deuxième, en une diminution de la production des érythrocytes (Menendez et al., 2000; Clark et Cowden, 2003). Le modèle de *Plasmodium chabaudi adami* nous permet de faire une comparaison entre une infection virulente et une infection non virulente chez le même hôte, soit la souris BALB/c. Nous avons ciblé le facteur d'inhibition de migration des macrophages (MIF) étant donné sa forte sécrétion chez de souris infectées par la souche virulente DS en comparaison avec la souche non virulente DK. Le MIF induit la production du facteur de nécrose tumorale (TNF)- α , de l'interféron (INF)- γ et de l'oxyde nitrique (NO), qui ont tous un effet néfaste dans la pathologie du paludisme (Calandra et Roger, 2003), et semble diminuer la cytodifférentiation ainsi que la production d'hémoglobine (McDevitt et al., 2006). En plus, l'infection de souris BALB/c déficientes en MIF par *P. chabaudi chabaudi* (souche AS) se caractérisent par moins d'anémie et plus de survie (McDevitt et al., 2006). Nous avons donc évalué le rôle de MIF dans la virulence associée à l'infection par *P.c. adami*. et ce, par sa neutralisation *in vivo* avec un anticorps monoclonal.

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

Le paludisme est une maladie transmise par des moustiques du genre *Anophèle* et causé par un parasite du genre *Plasmodium*, ayant des répercussions économiques et sociales importantes. De nos jours, le paludisme se retrouve dans les régions tropicales et subtropicales du monde où il est responsable de plus de 300 millions de cas et cause entre un à trois millions de morts annuellement (Hisaeda *et al.*, 2005). Quatre-vingt-dix pour cent des décès dus au paludisme surviennent en Afrique et au sud-est du Sahara, et ce, principalement chez les enfants de moins de cinq ans (Lamb *et al.*, 2006). L'âge de l'hôte ainsi que sa prédisposition génétique sont deux facteurs déterminants dans l'évolution de l'infection par *Plasmodium* (Roetynck *et al.*, 2006a). Malgré tous les efforts faits par la communauté scientifique, aucune solution efficace, par exemple un vaccin, n'existe actuellement afin de combattre le paludisme. L'utilisation de médicaments (Cunha-Rodrigues *et al.*, 2006) et d'insecticides (Cui *et al.*, 2006) a échoué vu la capacité d'adaptation du parasite et de l'*Anophèle* aux différents traitements existants. En plus de la résistance aux médicaments, le parasite possède des mécanismes afin de déjouer le système immunitaire de l'hôte, tel que la diversité antigénique qui dépend de l'aptitude du parasite à finement réguler l'expression des gènes afin que l'hôte soit en contact avec seulement une petite proportion des antigènes parasitaires à la fois. En plus, *Plasmodium* alterne les antigènes présents à la surface des érythrocytes infectés afin de contrer l'effet du système immunitaire (variation antigénique) (Dzikowski *et al.*, 2006).

1.1 Le parasite

Le paludisme est provoqué par un protozoaire appartenant à l'ordre des Eucoccidia, du sous-ordre des Hemosporidea, de la famille des *Plasmodiidae* et du genre *Plasmodium*.

1.1.1 Le cycle de vie de *Plasmodium*

Le parasite *Plasmodium* a un cycle de vie inter-espèce, lequel est divisible en deux étapes. La première étape se situe chez les vertébrés et la seconde étape se déroule chez les invertébrés, plus précisément chez les femelles du genre *Anophèle*. Chez les vertébrés, le cycle de vie est divisé en deux phases : soit une phase exoérythrocytique et une phase érythrocytique (Goldsby et Goldsby, 2003b).

Le tout commence par la piqûre d'un insecte qui, lors de sa prise de sang, injecte des sporozoïtes qui proviennent des glandes salivaires de l'*Anophèle*, amorçant ainsi l'infection par *Plasmodium* chez l'hôte vertébré. En seulement quelques minutes, les sporozoïtes migrent vers le foie où ils pénétreront les hépatocytes et engendreront une phase de maturation et de réplication asexuée qui constitue la phase exoérythrocytique. En réponse à cette maturation, entre 6 à 7 jours et pouvant aller jusqu'à quatre semaines (Webster et Adrian, 2003; Suh et al., 2004), chaque sporozoïte engendrera de 30000 à 40000 mérozoïtes qui seront relâchés dans la circulation sanguine. Certaines espèces (*P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale*) développeront des formes mononucléaires hépatiques, hypnozoïtes, qui peuvent entrer dans une phase de latence et qui seront responsables de la réapparition du paludisme (Lalloo et al., 2007). Chaque mérozoïte libéré du cycle exoérythrocytique pourra infecter un érythrocyte et, à l'intérieur de celui-ci, des changements morphologiques se produiront afin de générer un trophozoïte. La maturation des trophozoïtes amène à la différenciation en schizontes et ensuite en mérozoïtes. Cette division asexuée permet la génération de plus de 32 mérozoïtes pour chaque mérozoïte initial, après une période de 2 à 3 jours, dépendant de l'espèce du parasite. À la suite de la rupture de l'érythrocyte, il y a libération de mérozoïtes, des déchets métaboliques du parasite ainsi que du pigment paludéen, l'hémozoïne (Hz). La libération des mérozoïtes permet la propagation de l'infection à d'autres érythrocytes et la continuation du cycle de vie de *Plasmodium*. Suite à l'invasion des érythrocytes, une infime

proportion de parasites asexués va se différencier en gamétocytes mâles et femelles, qui sont essentiels pour la transmission de l'infection à d'autres hôtes par le vecteur (Goldsby et Goldsby, 2003b; Hisaeda et al., 2005). Le cycle de vie de *Plasmodium* comporte aussi une partie sexuée qui se déroule chez l'insecte (Goldsby et Goldsby, 2003b; Vlachou et al., 2006).

1.1.2 Modèle de laboratoire

Chez l'humain, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. falciparum* causent le paludisme, avec différentes répercussions chez les individus infectés (Stevenson et Riley, 2004). De plus, *P. falciparum*, l'espèce la plus commune en Afrique et au sud du Sahara, est responsable de la majeure partie des infections mortelles dans ces régions (WHO, 2006b). L'infection par *Plasmodium falciparum* peut entraîner des complications sous la forme cérébrale ainsi qu'une anémie sévère, tout dépendant de l'âge de la personne infectée (Fernandes et al., 2008).

Plusieurs espèces de *Plasmodium* murin ont été isolées à partir des rongeurs sauvages en Afrique (*Thamnomys rutilans*). La biologie des espèces de *Plasmodium* des rongeurs semble partager quelques caractéristiques communes à *P. falciparum*. *P. berghei* a été la première espèce découverte chez les rongeurs sauvages en 1948. Depuis ce temps, plus d'une dizaine d'espèces de *Plasmodium* furent découvertes. Les principales espèces utilisées en recherche sont mentionnées dans le Tableau I.

Tableau I : Espèces de *Plasmodium* murin principalement utilisées en recherche.

Espèces	Souche	Organes de séquestration	Préférence dans l'infection des érythrocytes	Pathologie associée à la létalité
<i>P.berghei</i>	ANKA	Cerveau, poumon et tissus adipeux	Réticulocytes	Paludisme cérébral
<i>P.yoelii yoelii</i>	17X	Cerveau	Réticulocytes et érythrocytes	Anémie
<i>P.yoelii yoelii</i>	17XL		Réticulocytes et érythrocytes	Anémie et paludisme cérébral (Sarfo <i>et al.</i> , 2005)
<i>P.chabaudi chabaudi</i>	AS	Rein et cerveau	Érythrocytes	Anémie
<i>P.chabaudi chabaudi</i>	AJ	Rein	Érythrocytes	Anémie
<i>P.chabaudi adami</i>	DS		Érythrocytes	Anémie
<i>P.chabaudi adami</i>	DK		Érythrocytes	Anémie
<i>P.vinckeii vinckeii</i>			Érythrocytes	Anémie

(Tableau inspiré de Lamb et al, 2006)

Tout dépendant de l'espèce de *Plasmodium* murin utilisé, les caractéristiques de l'infection varient, ce qui dépend aussi de l'haplotype de souris utilisée. Les souches de souris ainsi que l'espèce et la souche de *Plasmodium* murin influencent grandement les signes pathologiques qui peuvent s'apparenter avec ceux du paludisme humain (Lamb et al., 2006). Donc, chacune des souches murines présente des caractéristiques génétiques qui la prédisposent à une certaine réaction en réponse à une infection par *Plasmodium*.

1.1.3 *Plasmodium chabaudi adami*

P. chabaudi (P.c) est un parasite murin découvert en 1965 par Landau, qui partage plusieurs similitudes avec *P. falciparum* tel que l'infection des érythrocytes matures et la séquestration (Taylor-Robinson, 1995) et qui représente le modèle murin le plus exploité pour étudier les mécanismes immunitaires et les vaccins (Stevenson et Riley, 2004; Lamb et al., 2006). Les souches *P. c. adami DS* et *DK* ont des infections et des caractéristiques très

différentes chez la souris BALB/c (Figure 1,1), ce qui s'avère utile pour étudier les facteurs associés à la virulence dans un même hôte.

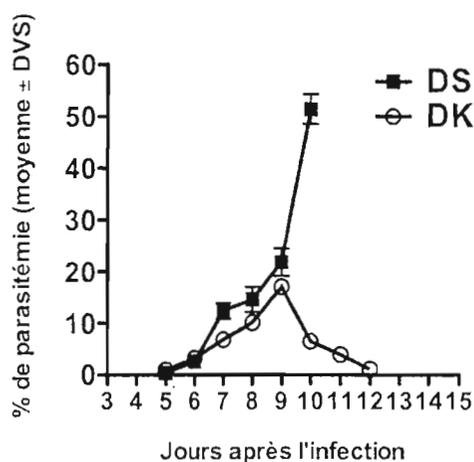


Figure 1,1 : Progression de la parasitémie en fonction du temps (Cambos et al., 2008)

La souche DK est caractérisée par une infection non létale où la parasitémie progresse lentement pour atteindre un pic, de 17 à 23 %, et ensuite disparaître sur une période d'environ 15 jours. De plus, l'apparition des réticulocytes, le dernier précurseur avant les érythrocytes, est observée un à deux jours après l'atteinte du pic d'infection, permettant ainsi une diminution du niveau d'anémie (Villeval *et al.*, 1990). La souche DS donne lieu à une infection létale où la parasitémie progresse très rapidement et l'on observe un niveau de réticulocytes comparable à celui des souris naïves pendant toute la période de l'infection; il est probable que la souche DS de *Plasmodium chabaudi adami* entraîne une inhibition de l'érythropoïèse. (Villeval et al., 1990). Ces cinétiques d'infection sont aussi observées chez des souris A/J, C57BL/6 et C3H et CD1 (Scorza, données non publiées). Les mécanismes qui expliquent la différence en virulence entre les deux souches ne sont pas encore connus.

1.2 Érythropoïèse

Les érythrocytes proviennent de la différenciation des cellules souches de la moelle osseuse, un phénomène dénommé érythropoïèse (Longpré, 1994). Celle-ci commence par la

différenciation des cellules souches pluripotentes en cellules souches myéloïdes (CFU-GEMM). Les CFU-GEMM sont à la base de toutes les cellules sanguines myéloïdes, en excluant les lymphocytes T et B, ainsi que les cellules dendritiques lymphoïdes. Par la suite, les CFU-GEMM se différencient en précurseur BFU-E (burst-forming-unit-erythroid) qui, à leur tour, se différencient en précurseur CFU-E (colony-forming-unit-erythroid) (Longpré, 1994; Koury *et al.*, 2002). Les précurseurs CFU-E forment des colonies d'au moins 50 érythroblastes polychromatophiles et d'érythroblastes orthochromatophiles après une culture sur milieu semi-solide de deux et quatre jours, chez la souris et l'humain respectivement (Chang et Stevenson, 2004a). La progéniture immédiate du CFU-E est le proérythroblaste (pronormoblaste) qui est le premier précurseur cellulaire, morphologiquement reconnaissable, de la lignée érythroïde. Ensuite, le proérythroblaste continue sa maturation pour devenir un érythroblaste basophile, qui devient ensuite un érythroblaste polychromatophile (Longpré, 1994; Chang et Stevenson, 2004a). Subséquemment, l'érythroblaste polychromatophile devient un érythroblaste orthochromatophile (normoblaste) qui est le précurseur de l'érythrocyte polychromatophile ou réticulocyte. Les réticulocytes représentent les derniers précurseurs avant le stade final de maturation qui est celui des érythrocytes (Longpré, 1994; Chang et Stevenson, 2004a; Chang et al., 2004) (Figure 1,2). Il est à noter que nous retrouvons que très peu de réticulocyte dans la circulation sanguine, sauf ceux ayant atteint un stade très haut niveau de maturation. Plusieurs facteurs de croissance et des cytokines, en plus de l'érythropoïétine (EPO), doivent être présents afin de promouvoir l'érythropoïèse, incluant le facteur de stimulation de colonie de granulocytes (G-CSF), les interleukine (IL)-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-9 et IL-11, le facteur de croissance des cellules souches (SCF) et le facteur de croissance de l'insuline-1 (IGF-1) (Wickramasinghe et Abdalla, 2000; Chang et Stevenson, 2004a).

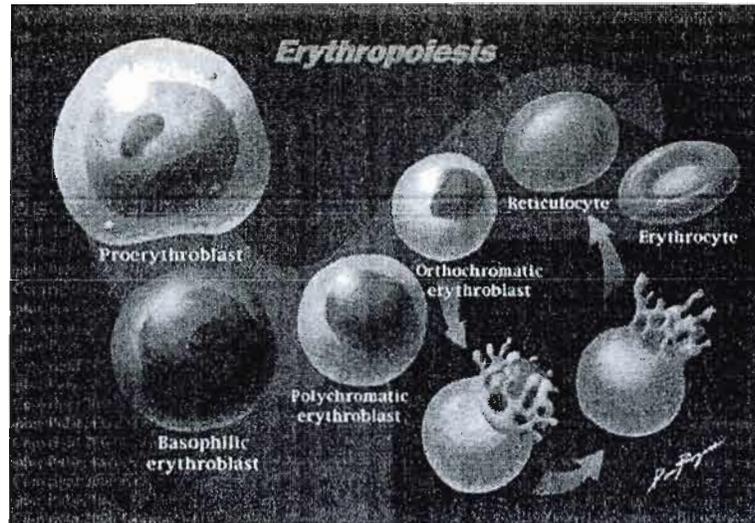


Figure 1,2 : Illustration des différents précurseurs érythropoïétiques,
www.graphicpulse.com/medill/wblood.html

Dans le passé, les différents précurseurs étaient identifiés sur la base de leurs différences morphologiques. Maintenant, de récentes techniques permettent d'identifier les différents précurseurs grâce aux différents marqueurs de surfaces. Il est donc possible de bien discriminer les différents stades de différenciation. Le tableau II nous montre quelques marqueurs de surface exprimés par les précurseurs érythropoïétiques.

Tableau II : Principaux marqueurs de surface exprimés par les précurseurs érythropoïétiques chez la souris.

	c-Kit	CD71	TER119	EPOR	Hb
BFU-E	+	+	-	+	-
CFU-E	+	+	-	++	-
Pronormoblastes	-	+++	-/+	++	-
Érythroblaste basophile	-	+++	++	++	-/+
Érythroblaste polychromatique	-	++	+++	-/+	++
Érythroblaste orthochromatique	-	+	+++	-/+	++++
Réticulocyte	-	-/+	+++	-	++++
Érythrocyte	-	-	+++	-	++++

(Tableau inspiré de (Lamikanra et al., 2007))

1.3 Anémie

Dans des conditions normales, le volume érythrocytaire et la concentration d'Hb restent en équilibre. Afin de préserver cet équilibre, des mécanismes régulateurs assurent la production des érythrocytes par la moelle osseuse et leur destruction par le système réticuloendothélial. De plus, le recyclage du fer dans le foie contribue au maintien de cette homéostasie (Weiss et Goodnough, 2005). L'anémie est donc une rupture de ce fragile équilibre, caractérisée par une diminution du nombre d'érythrocytes, du volume érythrocytaire et de la concentration d'Hb circulant dans le sang (Longpré, 1994). L'anémie survient lorsque les érythrocytes ne sont plus capables d'apporter suffisamment d'oxygène aux différents tissus de l'organisme. Lors de l'anémie, un dérèglement dans l'homéostasie du fer se produit, engendré par une augmentation de la recapture et de la rétention du fer par les cellules du système réticuloendothéliales. Cette rétention du fer limite sa disponibilité pour les précurseurs érythropoïétiques (Weiss et Goodnough, 2005). L'anémie touche tous les groupes de la population, mais ce sont surtout les femmes et les enfants qui sont

principalement ciblés dans les pays tropicaux et subtropicaux (WHO, 2006a). Chez l'Homme, il y a présence d'anémie quand le taux d'Hb est inférieur à 110mg/mL et que l'hématocrite est inférieur à 33 % (Longpré, 1994; Menendez *et al.*, 2000). Pour ce qui est d'une anémie sévère, la concentration d'Hb sanguine est inférieure à 50mg/mL et l'hématocrite est inférieur à 15 % (Menendez *et al.*, 2000; Suh *et al.*, 2004). Chez la souris, les valeurs normales d'hématocrites et d'hémoglobines sont de 44 % et de 134mg/mL, respectivement, ce qui correspond aussi aux valeurs normales chez l'Homme (Fox, 1984; Longpré, 1994).

1.3.1 Causes et mécanismes de l'anémie hémolytique

Le paludisme cause une anémie hémolytique intravasculaire caractérisée par une réduction de la durée de vie des érythrocytes (Clark *et al.*, 2006) ainsi que par la non-compensation de l'érythropoïèse dans la production d'érythrocytes (Longpré, 1994). Normalement, l'anémie apparaît suite à une augmentation de la destruction des érythrocytes, soit par hémolyse, cause principale de l'anémie paludéenne, ou lors d'une hémorragie. Afin de contrer cette destruction d'érythrocytes, le rein augmente la production d'EPO (Longpré, 1994; Baratin *et al.*).

L'EPO est une glycoprotéine plasmatique stimulant l'érythropoïèse, vraisemblablement produite en majeure partie par le rein et dont la sécrétion est induite par l'hypoxie (Chang et Stevenson, 2004b). L'EPO promeut l'érythropoïèse en stimulant la prolifération, la différenciation et la maturation des précurseurs érythropoïétiques. L'augmentation de l'érythropoïèse permet ainsi l'accroissement du nombre d'érythrocytes dans la circulation sanguine et l'élimination de l'anémie lors de l'infection par *Plasmodium* (Chang et Stevenson, 2004a).

La présence de *Plasmodium* entraîne une diminution de la production d'érythrocytes qui n'est pas due à un déficit d'EPO, mais bien à d'autres facteurs, puisque l'EPO se retrouve à une concentration optimale dans le sérum (Mohan et Stevenson, 1998a; Martiney *et al.*, 2000; Chang et Stevenson, 2004b). Par contre, certaines cytokines produites durant l'infection, comme le facteur de nécrose tumoral (TNF)- α , suppriment l'érythropoïèse (Casals-Pascual *et*

al., 2006). Des concentrations de TNF- α , d'IL-1 α/β et d'interféron (IFN)- γ , directement dépendantes de la sévérité de la maladie, ont été observées chez l'Homme (Menendez et al., 2000). Ces mêmes cytokines ainsi que l'oxyde nitrique (NO) participent à la dépression de la moelle osseuse, à la dysérythroïèse et à l'érythrophagocytose qui conduisent à l'anémie paludéenne (Kurtzhals et al., 1998; Menendez et al., 2000). De plus, l'action de l'EPO est diminuée par l'effet inhibiteur des cytokines pro-inflammatoires sur la prolifération des précurseurs érythroïétiques. En parallèle, la régulation à la baisse des récepteurs de l'EPO ainsi que la faible quantité de fer présent sont d'autres facteurs influençant l'inhibition de la prolifération cellulaire ainsi que l'inhibition de la synthèse de l'Hb (Weiss et Goodnough, 2005). Comme le fer est capté sous la forme d'hémozoïne (Hz) qui n'est pas métabolisée, il est donc impossible de le réutiliser (Weatherall et al., 2002).

La rupture des érythrocytes, qui permet la libération de mérozoïtes à la fin du stade de développement asexué, représente une des plus importantes causes de l'anémie (Jandl, 1987). De plus, certains chercheurs suggèrent qu'une augmentation dans la phagocytose des érythrocytes non infectés aurait un impact majeur sur l'anémie suite à une infection par *Plasmodium* (Waitumbi *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2006).

La destruction accrue des érythrocytes est influencée par une plus courte durée de vie des érythrocytes, par la phagocytose par les macrophages des érythrocytes infectés et non infectés (Clark et al., 2006), par l'hémolyse impliquant le complément et par la perte des protéines régulatrices du complément à la surface des érythrocytes (CR1 et CD55) (Chang et Stevenson, 2004a; Mackintosh et al., 2004).

Pour ce qui est de la diminution de la production d'érythrocytes, des anomalies morphologiques chez les précurseurs érythroïétiques ont été observées, ainsi que la dysérythroïèse (Clark et al., 2006), due à l'effet des facteurs parasitiques, des cytokines inflammatoires et par la présence des infections concomitantes (Paul et Brey, 2003; Chang et Stevenson, 2004a). Ces mécanismes sont influencés par l'âge, par la grossesse, par le statut immunitaire antipaludéen, par la génétique de la personne ainsi que par le niveau local d'épidémie (Menendez et al., 2000).

Un autre phénomène pouvant soutenir l'anémie, lors d'une infection par *Plasmodium*, est lié à la production de NO qui semble inhiber la pompe Na^+/K^- chez les érythrocytes et engendrer une perte de leur flexibilité (Clark et al., 2006). La rate permet l'élimination des particules inertes, des différents pathogènes et des érythrocytes sénescents ou avec des aberrations. Donc, lorsque les érythrocytes non flexibles entrent dans la rate, ils n'ont pas la capacité de passer au travers des cellules épithéliales et sont phagocytés par les macrophages et ensuite éliminés (Krucken *et al.*, 2005). Tout comme le NO, il semblerait que l'Hz, en augmentant le stress oxydatif, causerait un durcissement de la membrane des érythrocytes non infectés (Dondorp et al., 2003). Lors d'une infection par *Plasmodium*, on remarque la production de plusieurs cytokines inflammatoires, entre autres le MIF qui aurait une importance dans l'inhibition de l'érythropoïèse (Calandra et Roger, 2003) et, par le fait même, dans l'augmentation de l'anémie. Le MIF inhibe l'érythropoïèse de plusieurs façons : inhibition de la production de précurseurs érythropoïétiques, diminution de la quantité d'Hb produite, diminution de la production de réticulocytes et diminution de la cytodifférenciation (Martiney et al., 2000; McDevitt et al., 2006). De plus, des facteurs parasitaires, comme l'Hz, engendrent une augmentation de la production de MIF et donc une augmentation de l'inhibition des précurseurs érythropoïétiques (Casals-Pascual et al., 2006). Le MIF permet la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires, comme le $\text{TNF-}\alpha$ et l' $\text{IFN-}\gamma$, et ces mêmes cytokines induisent, à leur tour, la production de MIF (Gando *et al.*, 2001; Lue *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2006).

1.4 Cellules NK (Tueuses naturelles)

Lors de l'infection par *Plasmodium*, plusieurs types cellulaires sont activés durant l'inflammation. Dans la réponse immunitaire précoce, l'IL-12 et IL-18 produites par les macrophages et cellules dendritiques activent les cellules Natural Killer (NK), qui à leur tour secrètent l' $\text{IFN-}\gamma$ et expriment des marqueurs d'activation (CD25 et le CD69) (Stevenson et Riley, 2004, Roetyneck et al., 2006b). Il est important de mentionner que les lymphocytes sont subdivisés en trois populations : les lymphocytes T, les lymphocytes B et les cellules Natural Killer (NK). Nous nous sommes intéressés aux cellules NK, puisque dans la phase précoce du paludisme elles semblent être les principales productrices d' $\text{IFN-}\gamma$ (Artavanis-

Tsakonas et Riley, 2002). En plus, leur cytotoxicité est augmentée rapidement lors de la réponse innée suite à une infection par *Plasmodium*. Les cellules NK sont de larges granulocytes qui n'expriment pas les marqueurs habituels des lymphocytes B et T. Ces cellules sont nommées NK puisqu'ils ont une cytotoxicité non spécifique. Elles composent de 5 à 10 % de la population lymphocytaire circulatoire et jouent un rôle primordial dans la réponse immune contre des pathogènes et des tumeurs (Hayakawa et Smyth, 2006). De récentes études démontrent que les cellules NK influencent l'immunité innée et acquise. De plus, elles jouent un rôle important dans la régulation de la réponse immunitaire (Goldsby et Goldsby, 2003a) par ses interactions avec les cellules présentatrices d'antigène (CPA), plus particulièrement les cellules dendritiques. La présence de cellules NK est observée dans plusieurs organes, et ce, tout au long du développement, dans la moelle osseuse, dans le foie, dans le thymus, dans les nodules lymphatiques et dans la rate, et ce, dans des proportions différentes (Di Santo et Vosshenrich, 2006).

L'activité des cellules NK est stimulée par l'IFN- α , l'IFN- β et de l'IL-12. Après stimulation, les cellules NK sécrètent des perforines, granzymes et plusieurs ligands de la famille des TNF qui vont conduire à l'apoptose des cellules transformées. De plus, elles sécrètent : l'INF- γ , et les IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6 et IL-13, le facteur de stimulation des colonies macrophages (M-CFS), le facteur de stimulation de colonie des granulocytes et des macrophages (GM-CFS), le facteur de stimulation de colonie des granulocytes (G-CFS), facteur d'inhibition de leucémie (LIF) et le TNF- α (Saito et al., 1993; Roetyneck et al., 2006a; Yoon et al., 2007). L'IL-2 et l'IFN- α/β entraînent une augmentation des capacités cytolytiques des cellules NK. Suite à leur activation, les cellules NK vont directement lyser les cellules cibles par l'exocytose des perforines et des granzymes ou sécréter des cytokines, comme l'INF- γ et le TNF- α qui font partie de la réponse immunitaire (Lodoen et Lanier, 2006). La sécrétion d'INF- γ , par les cellules NK, nécessite la présence de l'IL-12, mais aussi la présence de monocytes/macrophages (Lodoen et Lanier, 2006; Roetyneck et al., 2006a; Roetyneck et al., 2006b). De récentes études démontrent qu'en plus de l'IL-12, l'IL-18 est essentielle à la production de l'INF- γ par les cellules NK (Hayakawa et Smyth, 2006; Reading et al., 2007). L'effet de l'INF- γ sur les cellules NK est remarquable, puisqu'elle permet leur activation et la production de TNF- α , d'IL-12p40 et de granzyme B. De plus.

cette cytokine pro-inflammatoire peut agir de manière autocrine ou paracrine sur les cellules NK (Mavoungou et al., 2003).

Les cellules NK reconnaissent principalement leurs cellules cibles par leurs propres récepteurs, et éliminent les cellules tumorales ou infectées par un virus lorsque les cellules ont une déficience du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I. Cette élimination spécifique est dépendante de la liaison du complexe inhibiteur CD94/NKG2A, qu'on retrouve chez les humains et les souris, et d'un récepteur inhibiteur de la famille Ly49 chez la souris et du récepteur KIR (killer cell immunoglobulin-like receptor) chez les humains (Yoon et al., 2007).

De récentes données montrent que les cellules NK expriment différents récepteurs des chimiokines ainsi que plusieurs molécules d'adhésion qui régulent leur mobilité *in vivo* et *in vitro*. Chez la souris, une activation des cellules NK par le ligand CX3CR1 (fractalkine) est observé, ce qui suggère une expression fonctionnelle des récepteurs de chimiokines sur les cellules NK. Le recrutement des cellules NK dans le site de stimulation tumorale est guidé par un mécanisme dépendant du TNF- α . Les cellules NK ont donc la capacité de migrer vers un site de réponse immune dans un contexte de gradient de chimiokines ou de cytokines (Hayakawa et al., 2006).

1.4.1 Développement des cellules NK

Le mécanisme détaillé selon lequel les précurseurs des cellules NK (pNK) se développent en cellules NK matures n'est pas encore complètement élucidé. Les cellules NK acquièrent un phénotype de surface spécifique ainsi que leur fonction cytolytique durant le processus de différenciation. Les pNK se retrouvent principalement dans la moelle osseuse, mais on en retrouve aussi dans le thymus, dans la rate et dans les nodules lymphatiques (Yoon et al., 2007). Chez la souris, les pNK expriment le CD122, une sous-unité commune du récepteur de l'IL-2/IL-15. Par ce récepteur, l'IL-15 produite par les macrophages et les cellules stromales, induit le signal critique dans la maturation des cellules NK et l'expression du marqueur NK1.1 ainsi qu'un nombre d'autres récepteurs fonctionnels tels que CD94/NKG2A et Ly49. Les cellules NK matures expriment fortement le CD11b (Mac-1) et le CD43 (Figure

1,3) (Di Santo, 2006; Di Santo et Vosshenrich, 2006; Hayakawa et al., 2006). Le microenvironnement de la moelle osseuse est la source principale des cytokines qui facilitent la différenciation et les cellules stromales assistent le microenvironnement dans la maturation complète des cellules NK (Yoon et al., 2007).

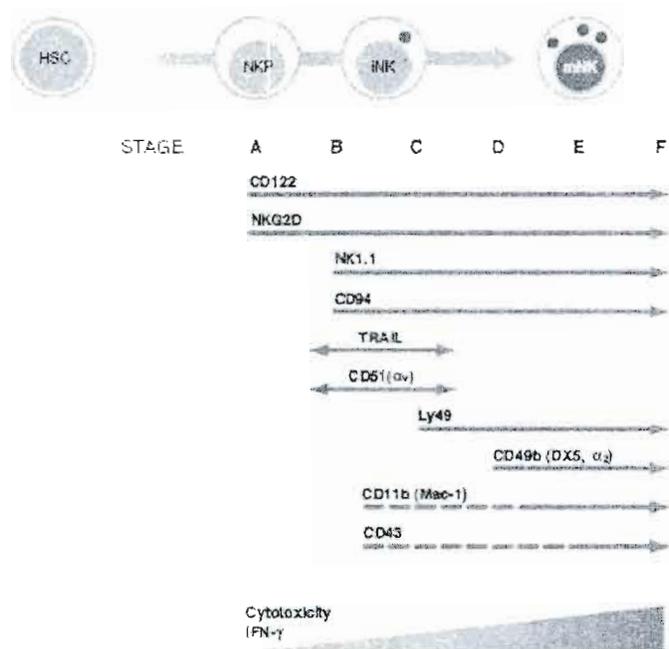


Figure 1,3 : Marqueurs phénotypiques caractérisant le développement des cellules NK (Di Santo, 2006)

1.4.2 Rôles des cellules NK dans le paludisme

Une augmentation marquée et rapide de la cytotoxicité des cellules NK a été remarquée durant les infections par une variété de parasites protozoaires, comme le *Plasmodium*, ce qui suggère que les cellules NK ont un rôle dans l'immunité innée contre ces pathogènes. Il semble que les cellules NK soient la source principale d'IFN- γ dans la phase précoce de l'infection, donc avant qu'une activation des cellules T spécifiques du parasite se produise (Stevenson et Riley, 2004). Il devient donc de plus en plus évident que les cytokines produites influencent la forme sanguine paludéenne, et que la production précoce d'IFN- γ joue un rôle majeur dans ce processus (Stevenson et Riley, 2004; Roetynck et al., 2006a). Il

devient aussi évident que les cellules NK, par leur action directe sur les fonctions immunitaires effectrices, participent non seulement au contrôle initial d'infections microbiennes, mais aussi dans l'initiation de la réponse immunitaire adaptative (Roetynck et al., 2006b). Dans la phase précoce d'infection par *P. chabaudi* AS, un rôle protecteur fût attribué aux cellules T auxiliaires (T_H1) soutenue par la production de cytokines pro-inflammatoires, comme l'INF- γ et le TNF- α , tandis qu'une réponse T_H2 semble favoriser le développement d'un paludisme sévère et mortel (Roetynck et al., 2006b). De récentes études démontrent que la déplétion des cellules NK par un anticorps anti-NK1.1 induit une augmentation dans la susceptibilité des souris C57BL/6, à l'infection par *P.c. chabaudi* (souche 54X) (Wiser et al., 1997). Une activité accrue des cellules NK est remarquée au pic de l'infection chez des souris C57BL/6 infectées avec *P. chabaudi* (Eugui et Allison, 1980; Roetynck et al., 2006a). Il semble que la production de cytokines par les cellules NK, et non la cytotoxicité, contribue à la résistance contre les infections au niveau sanguin par *P. chabaudi* (Roetynck et al., 2006a).

La stimulation des cellules NK par des érythrocytes infectés par *Plasmodium* augmente la production d'IFN- γ et régule à la hausse les marqueurs d'activation tels que le CD25 et le CD69 (Lodoen et Lanier, 2006). Pour qu'une production d'IFN- γ se produise, la présence d'IL-12 est nécessaire, mais ni le type cellulaire produisant l'IL-12 ni le mécanisme en réponse à des érythrocytes parasités ne sont pas encore déterminés. Par contre, des cellules NK purifiées mises en présence d'érythrocytes infectés ne produiront pas d'IFN- γ . Comme dit précédemment, la présence de monocytes/macrophages est essentielle à la production d'IFN- γ (Roetynck et al., 2006b). C'est la production de l'IL-18, par les monocytes/macrophages, qui permet la sécrétion d'IFN- γ par les cellules NK, lors de l'infection par *Plasmodium* (Roetynck et al., 2006a). Les récepteurs de type Toll (TLR), plus précisément les TLR-2, 9 et 11 sont individuellement impliqués dans l'activation des cellules NK, et ce, par l'activation de MyD88, un adaptateur universel des TLR nécessaire à l'activation du NF- κ B (Gazzinelli et Denkers, 2006). L'expression du récepteur de l'IL-18 par les cellules NK, et la production d'IL-18 par les macrophages sont des composantes essentielles dans l'activation des cellules NK durant l'infection par *Plasmodium* (Baratin et al., 2005).

1.4.3 Cellules NK et MIF

Une étude précédente a démontré que le MIF, une cytokine pro-inflammatoire se trouvant dans l'humeur aqueuse, produit une inhibition immédiate de la cytotoxicité engendrée par les cellules NK chez les cellules cibles normales et chez des cellules néoplasiques (Apte et al., 1998). Le MIF n'a pas un effet toxique direct sur les cellules NK, mais il agit plutôt en exerçant son effet inhibiteur en détériorant la libération des granules de perforines cytolytiques par les cellules NK. L'effet immunosuppresseur de MIF est restreint aux cellules NK (Apte et al., 1998). Une autre recherche a démontré que le MIF induit une inhibition de l'activité cytotoxique des cellules NK (Arcuri et al., 2006).

Une récente recherche a démontré que les cellules NK utérines (uNK) sont une source et une cible de MIF, ce qui démontre que cette cytokine a un rôle important dans la reproduction chez les humains (Arcuri et al., 2006). La neutralisation de MIF par un anticorps neutralisant augmente l'activité cytolytique des cellules uNK, ce qui confirme son rôle comme immunorégulateur de cette population lymphocytaire (Arcuri et al., 2006).

1.5 Facteur d'inhibition de migration des macrophages (MIF)

Le MIF est l'une des premières cytokines à avoir été identifiée, comme ayant une action dans la réponse immunitaire innée et acquise (Augustijn et al., 2006). De plus, le MIF est aussi considéré comme une hormone et une enzyme (Kleemann *et al.*, 2000). Le MIF est exprimé par plusieurs cellules et tissus, mais principalement par ceux qui ont un contact direct avec l'environnement de l'hôte. Les principales sources de MIF dans le système immunitaire sont les lymphocytes T, les monocytes/macrophages, les lymphocytes B, les cellules dendritiques sanguines ainsi que plusieurs autres cellules (Baugh et Bucala, 2002; Calandra et Roger, 2003). Une sécrétion de MIF, par les cellules de l'hypophyse antérieure, a été remarquée et s'avère essentielle dans la réponse inflammatoire, puisque le lipopolysaccharide (LPS) induit la libération de MIF chez l'hypophyse antérieure, ce qui permet l'induction de la réponse inflammatoire (Bernhagen et al., 1998). Donc, le MIF a une action sur le système endocrinien et sur le système immunitaire. Le MIF est impliqué dans une multitude de maladies, tel le choc septique, l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, les

maladies inflammatoires pulmonaires, les réactions d'hypersensibilités retardées, les colites ulcéraives ainsi que le cancer (Clark et Awburn, 2002; Lue et al., 2002; Morand et al., 2006; Lue et al., 2007).

Le MIF est un médiateur des macrophages et des lymphocytes T, permettant de réguler les effets anti-inflammatoire et immunosuppresseur des glucocorticoïdes. Les glucocorticoïdes sont des hormones stéroïdiennes sécrétées par la glande corticosurrénale qui ont une action sur le métabolisme des glucides et des protéines (Silverthorn *et al.*, 2000), et inhibe les cytokines produites par les macrophages et les cellules T (Baugh et Bucala, 2002; Calandra et Roger, 2003). Des recherches montrent un rôle diamétralement opposé pour le MIF dans la prolifération des lymphocytes T (Ziino et al., 2005); (Mitchell et al., 1999). Le MIF permet aussi de moduler l'adhérence, la phagocytose ainsi que l'augmentation de l'activité anti tumorale des macrophages (Baugh et Bucala, 2002). Le MIF est exprimé constitutivement de manière intracellulaire et, lors de sa sécrétion, il ne requiert pas la synthèse *de novo*. Pour sa sécrétion, le MIF n'emploie pas la voie classique, soit le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, mais plutôt des mécanismes non classiques (McDevitt et al., 2006). En effet, la sécrétion de MIF requiert la fonction des protéines transporteurs ABC, dans au moins une des étapes du processus sécrétoire (Flieger et al., 2003). La sécrétion de MIF par le macrophage est rapide et des concentrations de LPS, de 10 à 100 fois inférieures à celles requises pour induire la production de TNF- α , sont nécessaires (Baugh et Bucala, 2002). Le MIF est aussi reconnu comme un médiateur de la réponse inflammatoire chronique et aiguë. Comme il fonctionne de manière autocrine et paracrine, le MIF a un effet stimulant sur la croissance cellulaire et augmente la production des cytokines et des molécules inflammatoires (Nishihira, 2000). Il est libéré dans la circulation suite à un traitement avec de l'endotoxine ou par des cytokines pro-inflammatoires incluant le TNF- α et l'IFN- γ , ainsi qu'en présence d'Hz (Bernhagen et al., 1998; Calandra et Roger, 2003). Le MIF est une cytokine pro-inflammatoire qui agit directement en activant l'expression de TNF- α , d'IL-1 β , d'IL-2, d'IL-6, d'IFN- γ , la libération NO, l'expression des métalloprotéases 2 et l'induction de la cyclooxygénase II (COX II). La présence de MIF est nécessaire afin de maintenir un niveau optimal d'IL-1, de TNF- α et de Prostaglandine E₂ (PGE₂) (Leng *et al.*, 2003).

1.5.1 Mode d'action de MIF

Il a été démontré que le CD74, la chaîne invariante du CMH II ayant une structure transmembranaire de type II trimérique (Leng et al., 2003), se lie au MIF avec une forte affinité de liaison (Yan et al., 2006). Le CD74 est exprimé par les macrophages, les cellules T matures et les cellules B. Pour que le récepteur de MIF active la cascade cellulaire, le CD74 doit être couplé avec le CD44 (H-CAM). Le CD44 est une glycoprotéine membranaire de type I qui est exprimée par une variété de cellules, comme les macrophages, les leucocytes, les érythrocytes et les fibroblastes (IMGENEX, 2007). Lorsque MIF se fixe sur le CD74, il engendre la phosphorylation de la partie cytoplasmique du CD74 et du CD44, ce qui permet l'activation de la kinase Src (Virus du sarcome de Rous), ce qui entraîne la cascade enzymatique emmenant à l'activation d'ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases). Cette activation conduit à la phosphorylation de la phospholipase A₂ cytoplasmique (cPLA₂) et à l'induction de la voie pro-inflammatoire (Calandra et Roger, 2003; Shi et al., 2006). L'activation de la voie pro-inflammatoire inhibe la protéine p53 et induit l'inflammation, la croissance cellulaire et la tumorigenèse (Mitchell *et al.*, 2002). La protéine p53 a comme rôle d'inhiber temporairement le cycle cellulaire, pour permettre à la cellule de réparer l'ADN lorsque celui-ci est endommagé. Si l'ADN endommagé est irréparable, la protéine p53 induit l'apoptose de la cellule (Toledo et Wahl, 2006). De plus, cPLA₂ est la principale cible pour contrôler l'inflammation, puisqu'elle peut être inhibée par les glucocorticoïdes (Baugh et Bucala, 2002; Calandra et Roger, 2003). À part l'induction de la voie pro-inflammatoire, il y a une activation des facteurs de transcription EST et PU.1, ce qui engendre une augmentation des TLR-4 à la surface des macrophages et qui confère à MIF un rôle important dans la réponse immunitaire innée (Roger et al., 2001; Calandra et Roger, 2003).

L'interaction entre MIF et Jab-1 (Jun activating binding protein) serait la base moléculaire de l'action de MIF (Kleemann et al., 2000). Le complexe Jab-1/CSN5 (JUN-activation domain-binding protein 1 et COP9 signalosome subunit 5) active le JNK (JUN N-terminal kinase) qui, à son tour, phosphoryle JUN, cette dernière fonctionne comme coactivateur de l'activateur AP-1 (activator protein-1), impliqué dans la croissance cellulaire, dans la transformation et dans la mort cellulaire. Une autre fonction de Jab-1 est l'induction

de la dégradation de la protéine suppresseur de tumeur p53. Les MIF et Jab-1 sont localisés dans le cytoplasme, à proximité des membranes cytoplasmiques, et le MIF inhibe l'effet positif de la régulation de Jab-1 sur l'activité de JUN et AP-1 (Kleemann et al., 2000; Calandra et Roger, 2003; Lue et al., 2006).

Récemment, il a été démontré que le MIF est un promoteur de la survie cellulaire par une activation rapide de la voie PI3-K/Akt (phosphatidylinositol 3-kinase/Akt), et ce, par son activité autocrine et paracrine (Lue et al., 2007). La voie PI3-K/Akt semble supprimer l'apoptose et semble être impliquée dans l'angiogenèse, la migration des cellules endothéliales et comme dit précédemment promeut la survie cellulaire (Amin et al., 2003; Lue et al., 2007). La voie Akt est activée par la voie PI3K, et la phosphorylation de Akt se produit 1 minute après le traitement avec du MIF recombinant humain, avec une activation maximale à 10 minutes (Amin et al., 2003). Le MIF active PI3K et Src et ceci est le lien entre l'activation de la voie Akt et l'augmentation de la survie cellulaire engendrée par MIF (Lue et al., 2007).

Il ne semble avoir aucune interaction entre la cascade PI3-K/Akt et la cascade MEK/ERK (mitogen-activated protein kinase kinase), puisqu'un inhibiteur spécifique de chacune des voies n'interagit pas avec l'autre. Par contre, chacune de ces voies est essentielle à l'action de survie cellulaire du MIF (Amin et al., 2003).

1.5.2 MIF et le paludisme

Lors d'une infection par *P. c. chabaudi* AS, une augmentation de la production de MIF est observée (Martiney et al., 2000; McDevitt et al., 2006), due à la phagocytose des érythrocytes infectés, mais pouvant être occasionnée par la prise d'Hz par les macrophages. Le MIF conduit à l'inhibition de BFU-E, de CFU-GM et de CFU-GEMM, ce qui suggère qu'il est impliqué dans la pathophysiologie du paludisme associé à l'anémie (Martiney et al., 2000). L'inhibition de BFU-E se traduit par une diminution de la production des érythrocytes; pour ce qui est du CFU-GM, son inhibition engendre une prolifération et une différenciation altérée des neutrophiles (Martiney et al., 2000). Comme le CFU-GEMM est l'un des précurseurs de la plupart des cellules sanguines myéloïdes, une diminution de la

production des érythrocytes, des macrophages, des cellules dendritiques myéloïdes et autres est observée (Martiney et al., 2000; McDevitt et al., 2006), ce qui porte à croire que le MIF, par son action sur la production des érythrocytes, a une influence importante dans l'induction de l'anémie lors de l'infection par *Plasmodium*. De plus, le niveau de MIF en circulation est proportionnel à la sévérité du paludisme (McDevitt et al., 2006).

Un autre phénomène important, dans l'anémie, est l'inhibition de l'érythropoïèse par le MIF, et ce, même en présence d'EPO (Martiney et al., 2000; McDevitt et al., 2006). La signalisation cellulaire de l'EPO implique la MAP (mitogen-activated protein) kinase (MAPK) et l'action inhibitrice du MIF pourrait être soutenue par son effet sur les MAPK (McDevitt et al., 2006).

Une production de TNF- α chez les macrophages est remarquée, lors de la phagocytose des érythrocytes infectés ou de l'Hz. Le TNF- α a été considéré comme un inhibiteur de l'érythropoïèse (Martiney et al., 2000) mais, suite à des expériences avec des anticorps neutralisants contre les TNF- α , IL-1 β et IFN- γ , il a été conclu que ces cytokines ne sont pas des inhibiteurs puissants de l'érythropoïèse (Yap et Stevenson, 1994; McDevitt et al., 2006). De façon intéressante, l'IL-12 semble jouer un rôle important dans l'anémie paludéenne chez les modèles murins. L'IL-12 protège contre les maladies sévères tel le paludisme, en améliorant l'érythropoïèse (Keller *et al.*, 2006). Des injections d'IL-12, durant les premiers jours de l'infection par *P. c. chabaudi* AS, ont amenée à une production accrue des précurseurs érythropoïétiques, une augmentation de l'hématocrite et une augmentation de la production de réticulocytes (Mohan et Stevenson, 1998b), ce qui aide à contrer l'anémie engendrée par l'infection. Néanmoins, la phagocytose d'Hz native par les monocytes/macrophages entraîne une surproduction de l'IL-10 qui est un antagoniste de l'IL-12 (Keller et al., 2006), mais n'affecte pas la production de TNF- α . De plus, on constate que la production de TNF- α est contrôlée par les cytokines anti-inflammatoires, comme l'IL-10, et qu'une faible concentration d'IL-10 entraîne aussi l'augmentation de la production de NO (Kurtzhals et al., 1998).

Le MIF agit en synergie avec le TNF- α ou l'IL-12, pouvant favoriser l'anémie. L'Hz, les érythrocytes infectés et les autres produits d'origine parasitaire assurent l'induction du TNF- α , qui stimule l'érythrophagocytose et la désérythropoïèse de la moelle osseuse et donc, la

suppression de l'érythropoïèse (Martiney et al., 2000; McDevitt et al., 2006). L'érythrophagocytose amène à son tour à une production de TNF- α et d'IL-1, qui stimule la production d'IFN- γ , ce qui augmente d'avantage l'activation des macrophages (Wickramasinghe et Abdalla, 2000). Des concentrations élevées en MIF induisent la sécrétion de TNF- α par les macrophages qui, en synergie avec l'IFN- γ , génère la production de NO (Calandra *et al.*, 1994; Awandare *et al.*, 2006).

De récentes découvertes ont permis de démontrer l'existence d'un homologue structural du MIF mammalien chez les protozoaires : *Plasmodium* (PMIF) (Augustijn et al., 2006), *Trypanosome* (Reyes *et al.*, 2006), *Toxoplasma gondii* (Miska *et al.*, 2007), et chez des nématodes (Augustijn et al., 2006). Pour le moment, cet homologue a seulement été décrit chez *P.falciparum* et chez *P.berghei*. Chez des parasites PMIF knock-out (KO) ou déficients en PMIF, une augmentation du nombre de réticulocytes en circulation a été observée chez les souris infectées (Augustijn et al., 2006). De plus, PMIF se lie au même récepteur que le MIF mammalien, soit le CD74, avec une affinité plus élevée que celle du MIF mammalien. Des niveaux significatifs de PMIF sont retrouvés dans le cytoplasme des érythrocytes infectés. Une très faible homologie existe entre le MIF murin et le PMIF, il ne devrait donc pas y avoir de neutralisation du PMIF lors de l'ajout de l'anticorps neutralisant le MIF (Augustijn et al., 2006).

1.6 Récepteur du type TOLL (TLR)

Durant les premiers stades de l'infection, il est important que le système immunitaire inné de l'hôte puisse détecter et répondre rapidement aux infections par des protozoaires et ces actions sont réalisées par les récepteurs de type TOLL (TLR). La réponse engendrée par les TLR permet le développement de la réponse immunitaire adaptative, qui est nécessaire à la protection contre la réinfection (Gazzinelli et Denkers, 2006). Les TLRs sont essentiels dans plusieurs aspects de l'élimination des microbes, incluant le recrutement des phagocytes jusqu'aux tissus infectés ainsi que dans les étapes suivantes dans l'élimination des microbes. Les TLRs sont principalement exprimés par les cellules dendritiques et les macrophages, mais ils peuvent être exprimés par les cellules B et les cellules T (Takeda et Akira, 2005). Il

existe 13 TLR chez les mammifères, la souris exprime les TLR-1 à 13, et exprime le TLR-10 mais il n'est pas fonctionnel.

Lors des infections par *Plasmodium* différents TLR vont être activés. Par exemple, le glycoposphatidylinositol (GPI) présent à la surface des mérozoïtes va se lier au TLR-2 et 4 (Gazzinelli et Denkers, 2006). De plus, il semble que l'hémozoïne, le pigment paludéen, se lie au TLR-9 (Coban et al., 2005; Gazzinelli et Denkers, 2006). Durant les infections par *Plasmodium*, il semblerait que l'expression du TLR-2 et du TLR-4 soient augmentées (Loharungsikul et al., 2008). Comme les cellules NK jouent un rôle important dans l'immunité innée contre une infection par *Plasmodium*, il est important de noter que le TLR-2, -9 et -11 sont impliqués dans l'activation de ces cellules (Gazzinelli et Denkers, 2006).

1.6.1 MIF et TLR

Le MIF semble avoir une action sur l'expression génique et protéique de certains TLRs. Par exemple, chez les souris déficientes en MIF ou lors d'un traitement avec un anticorps neutralisant, comme nous avons étudié dans cette étude, une diminution de l'expression génique et protéique du TLR-4 est observée ce qui entraîne une diminution de la production de TNF- α en présence de son principal ligand, soit le LPS (Roger et al., 2001; Calandra et Roger, 2003). Par contre, l'expression génétique du TLR-2 ne semble pas varier lors de la neutralisation du MIF intracellulaire (Roger et al., 2001). Pour ce qui est des autres TLRs, il nous est impossible de dire si leur expression change lors de la neutralisation du MIF puisque aucune étude n'a été faite dans ce domaine.

La majeure partie des recherches effectuées sur le MIF a été faite avec des souris déficientes en MIF ou se sont des recherches de type descriptif. Sachant que le MIF est produit de manière constitutive, qu'il induit la production d'IFN- γ et de TNF- α , et qu'il inhibe l'érythropoïèse, est-ce que la neutralisation, et non l'élimination, du MIF sécrété aura une influence sur l'érythropoïèse et sur la production des cytokines pro-inflammatoires, dans le contexte d'une infection par *Plasmodium*. Pour ce faire, la neutralisation du MIF par un anticorps monoclonal anti-MIF sera effectuée et la production d'hémoglobine (Hb), des

différents précurseurs érythropoïétiques et des certaines cytokines pro et anti-inflammatoires sera observée. Notre hypothèse est que l'anémie présente lors des infections par *Plasmodium* résulte d'un environnement inflammatoire qui lui varie en fonction de la quantité de MIF production, qui est influencé par différents facteurs, comme l'hémozoïne. Cette recherche nous permettra de voir si le MIF est l'un des facteurs influençant la virulence des différentes souches de *Plasmodium*, ce qui serait un avancement important dans la compréhension de la pathologie de *Plasmodium*.

CHAPITRE II

DÉMARCHE MÉTHODOLOGIQUE

2.1 Souris, parasites et infection

Des souris BALB/c femelles, de six à huit semaines (Charles Rivers), ont été infectées avec dix mille (10^5) érythrocytes parasités (EP) de *Plasmodium chabaudi adami* DK ou DS par la voie intraveineuse (i.v.) ou par la voie intrapéritonéale (i.p.). La parasitémie a été calculée quotidiennement dans des frottis sanguins fixés au méthanol et colorés par une solution de 10 % de Giemsa (Sigma, Oakville, Canada). Les souris ont été euthanasiées dans une chambre à CO₂, ou par une ponction cardiaque suivit d'une dislocation cervicale. Cette étude a été réalisée avec le consentement du comité institutionnel de protection des animaux (CIPA) de l'Université du Québec à Montréal (protocole 0705-R1-508-0706).

2.2 Purification d'anticorps et neutralisation du MIF *in vivo*.

L'anticorps neutralisant anti-MIF (clone III.D.9, isotype IgG1) (gracieusement fourni par le Dr. Richard Bucala, Yale University) a été purifié comme décrit précédemment (Abe et al., 2001). L'anticorps isotype contrôle (IgG1) a été purifié à partir d'un surnageant de culture de l'hybridome 5D4-11 qui produit un anticorps spécifique pour le virus de la dengue de type 3 (ATCC, Manassas, États-Unis).

Pour étudier la contribution du MIF sécrété, des souris BALB/c (4 souris par groupe) ont été injectées avec l'anticorps neutralisant anti-MIF ou l'isotype contrôle (IgG1) (0,5 mg par la voie intrapéritonéale) trois jours avant le début de l'infection, le jour de l'infection, soit avec la souche DS ou la souche DK et à tous les trois jours suivants l'infection, et ce, jusqu'au sacrifice des souris.

2.3 Prélèvement des organes et isolement cellulaire

2.3.1 Prélèvement des cellules de la moelle osseuse

La moelle osseuse a été isolée de fémurs de souris âgées de six à huit semaines et récoltée avec du RPMI 1640 (GIBCO, Life technologies, Burlington, Canada) supplémenté de 100 U/mL de pénicilline/streptomycine (GIBCO, Life technologies, Burlington, Canada). La moelle osseuse a été récupérée en expulsant l'intérieur de l'os avec une seringue de 0,5 mL et d'une aiguille de 28 G contenant du RPMI. Les cellules ont été ensuite séparées par un pipettage délicat, et ce, à plusieurs reprises. Ensuite, les cellules ont été lavées dans 15 mL de RPMI 1640 à 1200rpm durant 10 minutes. Le culot cellulaire a été mis en suspension dans 2 mL de RPMI contenant 10% de sérum bovin fœtal (FBS) (HyClone, Ottawa, Canada) et 100 U/mL de pénicilline/streptomycine.

Pour faire la différenciation des macrophages, les cellules une fois prélevées et lavées, comme décrit précédemment, ont été mises en culture dans du DMEM High glucose (GIBCO, Life technologies, Burlington, Canada) supplémenté de 100 U/mL de pénicilline/streptomycine (GIBCO, Life technologies, Burlington, Canada) et de 10% FBS (HyClone, Ottawa, Canada) qui a été complété de 30% de surnageant de culture de la lignée de fibroblastes L929 (comme source de M-CSF) (ATCC, Manassas, Etats-Unis). Les cellules, à une concentration de 1×10^6 cellules par mL, ont été incubées pour une période de 6 jours à 37°C dans une atmosphère contenant 5% de CO₂. Les cellules adhérentes ont été décollées à l'aide d'un râtelier, comptées et ont servi pour le test d'inhibition de migration.

2.3.2 Prélèvement des cellules de la rate

Les splénocytes de souris ont été obtenus par dissociation tissulaire de la rate suite à un broyage dans une boîte de pétri avec une seringue de 3 mL dans du milieu RPMI contenant 100 U/mL de pénicilline/streptomycine. Les cellules spléniques ont ensuite été lavées à l'aide d'une solution de RPMI 1640 contenant 10% de FBS (HyClone, Ottawa, Canada). Le culot cellulaire a été resuspendu dans 1,5 mL de tampon de lyse des globules rouges (Sigma,

Oakville, Canada) durant 5 minutes sur glace. Après l'incubation, la suspension a été complétée à 15 mL avec du RPMI 1640 et centrifugée à 1200 rpm durant 10 minutes. Le culot cellulaire a été ensuite resuspendu dans 5 mL de RPMI contenant 10% de FBS (HyClone, Ottawa, Canada), 100U/mL de pénicilline/streptomycine (Gibco, Life technologies, Burlington, Canada) et 2 mM de β -mercaptoéthanol (Sigma, Oakville, Canada).

2.4 Purification cellulaire

Une suspension cellulaire de cellules spléniques provenant de souris infectées avec *P.c.adami* DK, traitées ou non traitées avec l'anticorps neutralisant anti-MIF, a été préparée. Afin d'évaluer la contribution des lymphocytes T ou CD90⁻ dans la production d'IFN- γ et de TNF- α , les cellules T ont été enlevées de la suspension cellulaire totale par triage magnétique, utilisant le « EasySep Mouse CD90.2 (Thy1.2) selection cocktail » (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), et des niveaux de pureté de 90 à 95 % ont été obtenus. Pour évaluer la contribution indirecte des cellules NK dans la régulation de la production d'IFN- γ et de TNF- α , les cellules NK provenant de la rate ont été purifiées par sélection positive en utilisant le « EasySep Mouse PanNK selection cocktail » (StemCell Technologies, Vancouver, Canada), et la production d'IFN- γ et de TNF- α de la suspension totale a été comparée avec celle dépourvue de NK. L'efficacité d'élimination a été vérifiée par un marquage avec l'anticorps monoclonal anti-panNK (Cerdarlane, Burlington, Canada) de souris conjugué au FITC et a été de 98 à 100 %.

2.5 Traitement *in vivo* avec de l'hémozoïne synthétique

Pour étudier la contribution de l'Hz sur la cinétique d'infection avec la souche non virulente de *P. c. adami* DK, un milligramme d'Hz dans 100 μ L de tampon phosphate salin (PBS) a été injecté, à chaque souris BALB/c (4 souris par groupe), par la voie intraveineuse à deux reprises, chaque dose séparée par 7 jours d'intervalle. Pour les souris non traitées avec de l'hémozoïne, 100 μ L de PBS ont été injectées. Les souris ont été infectées, une semaine après la deuxième dose d'Hz, avec 10^5 d'érythrocytes parasités et la parasitémie a été mesurée chaque jour, comme décrit précédemment.

2.6 Détermination de la concentration d'hémoglobine

La concentration d'Hb a été mesurée chez les souris témoins (traitées avec le témoin isotypique) et traitées avec l'anti-MIF immédiatement avant l'infection et à tous les deux jours suivant l'infection. Brièvement, deux microlitres de sang, provenant de la queue, ont été dilués dans 500 μ L du réactif de Drabkin (Sigma, Oakville, Canada) et la concentration d'Hb a été déterminée dans une plaque de 96 puits (Sarstedt, Montréal, Canada) dans un volume de 200 μ L en mesurant l'absorbance à 540 nm dans un lecteur de microplaque. Les valeurs ont été converties en milligrammes par millilitre (mg/mL) en utilisant une courbe standard d'Hb humaine (Sigma, Oakville, Canada) qui a été préparée dans le réactif de Drabkin. Tous les échantillons ont été mesurés en duplicata.

2.7 Compte des réticulocytes

Chaque jour, 2 μ L de sang ont été prélevés par le bout de la queue, dans 300 μ L de PBS, et ce, pour chaque souris. La suspension a ensuite été centrifugée à 1200 rpm durant 10 minutes. Le surnageant a été éliminé et le culot a été mis en suspension dans 0,250 mL d'une solution de glutaraldéhyde 0,025 % afin de fixer les cellules. Les cellules ont été conservées à 4°C pour plusieurs jours. Le jour de l'analyse, le glutaraldéhyde a été dilué avec 1 mL de PBS et centrifugé (étape de lavage). Les cellules ainsi lavées ont été mises en suspension dans 50 μ L de PBS contenant 1 μ L d'anti-CD71 (clone 217.1.4) conjugué à l'isothiocyanate fluorescente (FITC) (Cedarlane, Burlington, Canada). Les tubes ont été incubés à 4°C dans le noir durant 40 minutes. Finalement, les cellules ont été lavées avec du PBS et mises en suspension dans 1 mL de PBS contenant 5 μ L d'iodure de propidium (PI) (solution stock de 1mg/mL) (Sigma, Oakville, Canada). Les cellules ont ensuite été analysées par cytométrie en flux.

2.8 Dosage de la production d'IFN- γ , de TNF- α et IL-10

La production d'IFN- γ , de TNF- α et IL-10 a été mesurée dans le surnageant de cultures cellulaires (2×10^6 cellules/mL) après 72 heures chez des cellules spléniques totales, chez des cellules spléniques dépourvues de cellules T (CD90⁻), sur des cellules spléniques dépourvues de cellules T (CD90⁻) et de cellules NK (NK⁻) ainsi que chez des cellules dépourvues de

cellules T (CD90⁺) mais contenant des cellules NK (NK⁺) sur des souris naïves et infectées (traitées ou non avec de l'anti-MIF), en utilisant l'ensemble BD OptEIA™ pour l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-10 (BD Bioscience, Mississauga, Canada).

2.9 SDS-PAGE et immunobuvardage de MIF dans le sérum

Puisqu'aucune ELISA commerciale n'existe pour le dosage de MIF murin, il s'avérait que l'immunobuvardage soit la technique de choix pour quantifier le MIF dans des échantillons. Pour l'analyse du MIF dans le sérum, 10 μ L de sérum non dilué ont été déposés individuellement dans chacun des puits d'un gel de polyacrylamide de 15 %. La migration a été effectuée sur un système Bio-Rad minigel (Bio-Rad, Mississauga, Canada). Un marqueur de poids moléculaire (Pre-stained protein molecular weight marker) (Fermentas, Burlington, Canada) a été utilisé comme standard. Le MIF recombinant (R&D systems, Burlington, Canada) a été employé comme témoin positif. Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose de 0,20 μ m a été effectué avec le système mini-Trans-Blot (Bio-Rad, Mississauga, Canada) en suivant les instructions du manufacturier. La membrane a été bloquée avec 3 % d'albumine sérique bovine (BSA) (Sigma, Oakville, Canada) qui a été dissoute avec du PBS 0,05 % Tween 20 pour deux heures à la température ambiante. Pour la détection de MIF présent sur la membrane, un anticorps anti-MIF polyclonal (1:200, Biovision, Mountain View, États-Unis) dans le PBS-T 0,05% a été utilisé avec une incubation à 4°C durant toute la nuit. Un anticorps de bovin anti-lapin IgG biotynilé (1:3000, Cedarlane, Burlington, Canada) a été ajouté durant une heure à température ambiante, suivie d'une incubation avec un conjugué de peroxydase-streptavidine (1:2500, Amersham, Piscataway, États-Unis) de 1,5 heures à la température ambiante. Un substrat chimiluminescence (Pierce, Nepean, Canada) a été utilisé en suivant les instructions du manufacturier.

2.10 Cytométrie en flux

Les marquages effectués ont été préparés avec un anticorps monoclonal anti-CD71 de souris (clone 217.1.4) conjugué au FITC, et/ou avec un anticorps monoclonal anti-Ly76 de souris (clone TER119) conjugué à la phycoérythrine (PE) (Cedarlane, Burlington, Canada).

Un million de cellules en provenance de la moelle osseuse et de la rate, ont été mises en suspension avec du tampon phosphate salin (PBS) contenant 2 % de FBS. Les différents précurseurs érythropoïétiques, les proérythroblastes (ProE) (TER119^{med}, CD71^{high}, FSC^{high}), les érythroblastes basophiliques précoces (EryA) (TER119^{high}CD71^{high}FSC^{high}), les érythroblastes basophiliques tardifs et polychromatiques (EryB) (TER119^{high}CD71^{high}FSC^{low}) et les érythroblastes orthochromatiques ainsi que les réticulocytes (EryC) (TER119^{high}CD71^{low}FSC^{low}), ont été quantifiés comme décrits selon (Liu et al., 2006). Les cellules ont été incubées à 4°C durant 40 minutes. Avant de faire l'analyse des cellules aux cytomètre en flux, les cellules ont été lavées et mises en suspension dans 300 µL de PBS. La fluorescence a été détectée au FACScan (Becton Dickinson, Oakville, Canada) et les données ont été analysées en utilisant le logiciel WinMDI (version 2.6; <http://en.bio-soft.net/other/WinMDI.html>).

2.11 Test d'inhibition de migration

L'évaluation de l'activité neutralisante du MIF, soit l'anticorps monoclonale utilisé dans notre étude, a été faite dans une plaque de 24 puits avec des membranes « Transwell » de 6,5 mm (avec des pores d'une grosseur de 5,0 µm) (Corning, Lowell, États-Unis). Brièvement, 5×10^4 macrophages, dérivés de la moelle osseuse, ont été mis en suspension dans 200 µL de milieu complet et ont été déposés dans la chambre supérieure. Dans la chambre inférieure, du milieu complet a été mis, en présence ou en absence de 100 ng/mL d'une protéine chimiotactique des monocytes (MCP)-1 (R&D systems, Burlington, Canada). Deux cent nanogramme par mL d'anticorps monoclonal anti-MIF ou d'isotype contrôle ainsi que 100ng/mL de MIF recombinant ont été ajoutés dans la chambre supérieure. Les plaques ont ensuite été incubées durant 2 heures à 37°C contenant 5 % de CO₂. L'insert a ensuite été enlevé et les cellules ont été récupérées et le nombre de cellules dans la chambre inférieure a été déterminé par cytométrie de flux (Becton Dickinson, Oakville, États-Unis).

2.12 Analyses statistiques

La comparaison des données de souris traitées avec l'anti-MIF et traitées avec le témoin isotypique a été réalisée avec le t-test non paramétrique pour données non-pairées. Tous les

tests statistiques ont été effectués avec le logiciel GraphPad Prism (version 5,00; www.graphpad.com/prism).

CHAPITRE III

RÉSULTATS

3.1 Sécrétion de MIF lors de l'infection par *Plasmodium chabaudi adami*

Plusieurs cytokines sont produites durant les infections par *Plasmodium spp.* ayant une influence sur la pathologie de la maladie. La production de MIF lors d'une infection par une souche virulente et non virulente de *P. c. adami* a été suivie, et ce, dans le sérum de souris au pic de l'infection. La quantification de MIF a été effectuée par immunobuvardage en utilisant un anticorps polyclonal anti-MIF puisqu'aucun test commercial, tel qu'un ÉLISA ou RIA sont disponible pour les souris et rat et que la compatibilité des tests humains avec les rongeurs n'est pas encore défini. La spécificité de l'anticorps commercial anti-MIF n'a pas été vérifiée dans notre laboratoire mais a été garanti par le fournisseur : le signal détection est plus forte chez les surnageants de culture de macrophages traités par des oxydants, qui sont de forts inducteurs de MIF. La figure 3,1 démontre qualitativement la présence de MIF sérique chez trois souris infectées, par chacune des souches, et sacrifiées au pic de l'infection. Une augmentation accrue de la sécrétion du MIF a été observée chez les souris DK par rapport au témoin (souris naïves). Dans le puits 6, une détection plus faible de MIF a été observée, ce qui dénote une variabilité entre souris. Lors de l'infection avec la souche DS, une souche virulente de *P. c. adami*, une détection accrue de MIF a été observé dans le sérum de souris, et ce, en comparaison avec les souris naïves et les souris infectées avec la souche non virulente.

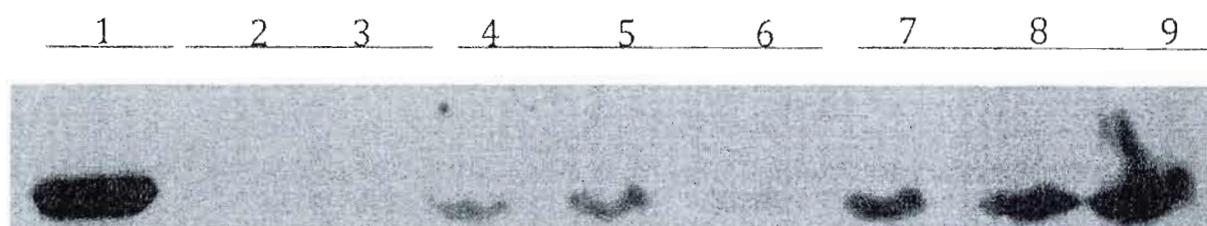


Figure 3,1 : La sécrétion de MIF est prononcée durant les infections par *P.c. adami* est en corrélation avec la parasitémie. Pour chaque expérience, 10 μ L de sérum de deux souris naïves et de deux souris infectées, prélevés au pic de l'infection, ont été séparés dans un gel de polyacrylamide de 15 % et suivis d'un immunobuvardage. Un anticorps polyclonal anti-MIF a été utilisé pour la détection de la protéine recherchée. La même quantité d'échantillons a été déposée dans chacun des puits. Le puits contient le MIF recombinant, les puits 2 et 3 contiennent le sérum de souris naïves, les puits 4-6 sérum de souris infectées avec la souche DK (parasitémie 16-20%) et les puits 7-9 du sérum de souris infectées avec la souche DS (parasitémie >40%). Représentation d'une expérience qui correspond à trois expériences dont le sérum provient de souris différentes.

3.2 La neutralisation de MIF *in vivo* amène à une diminution du pic de parasitémie lors de l'infection par *Plasmodium chabaudi adami*

Après une injection, par la voie intraveineuse, d'un inoculum d'érythrocytes parasités par *P. c. adami* DK (10^5 par souris), les souris BALB/c développent une parasitémie modérée qui atteint son pic (17 et 23 %) approximativement au jour 8 post-infection. Pour déterminer le rôle du MIF lors de l'infection par *Plasmodium*, la neutralisation *in vivo* du MIF a été effectuée, avec un anticorps monoclonal anti-MIF. Le traitement effectué consistait en une injection intrapéritonéale (i.p.) de 0,5 mg d'anticorps, à chacune des 4 souris de chaque groupe, trois jours avant l'infection, la journée de l'infection et à tous les trois jours jusqu'au sacrifice des souris. Lors du traitement avec l'anti-MIF, une diminution significative du pic de parasitémie a été observée (* $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$) (Figure 3,2). Cet effet a été constaté lors de deux expériences indépendantes, et était significatif dans les deux expériences. Dans l'expérience C, une diminution de la parasitémie a été observée tout au long de l'infection, et ce, jusqu'au pic d'infection (** $p < 0,01$) (Figure 3,2). Lors d'une infection par la souche virulente de *P. c. adami*, une diminution significative de la parasitémie, au pic de l'infection, est aussi observée chez les souris traitées avec l'anti-MIF, par rapport aux souris traitées avec le témoin isotypique (Figure 3,2D). Le potentiel de neutralisation de l'anticorps anti-MIF a été confirmé dans notre laboratoire dans un test d'inhibition de la migration et aussi vérifié par l'équipe de Bucala (Cordery et al., 2007). L'ajout de MCP-1 permet la migration des macrophages. Lors de l'ajout de MIF recombinant, une inhibition significative de la migration des macrophages est observée et lorsqu'on ajoute de l'anti-MIF, un retour au niveau du MCP-1 est retrouvé, ce qui confirme l'effet neutralisant de l'anti-MIF (figure 3,3) (* $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$).

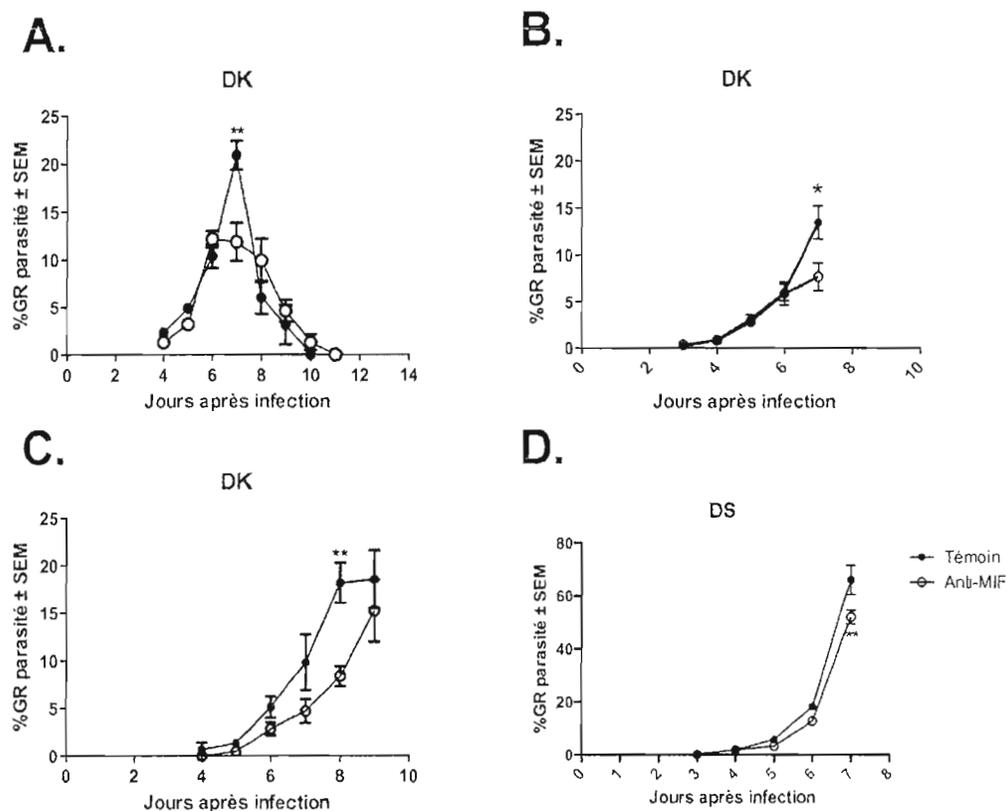


Figure 3,2 : La neutralisation du MIF réduit la parasitémie lors de l'infection par *P. c. adami*. Les souris ont été infectées par la voie intraveineuse (i.v) avec 10^5 érythrocytes parasités par la souche DK (A à C) et par la souche DS (D), et ont été traitées (cercle blanc) avec 0,5 mg d'anticorps monoclonal neutralisant anti-MIF aux jours -3, 0, 3 et 6 après l'infection ou avec 0,5 mg d'anticorps isotype contrôle (IgG1) aux jours -3, 0, 3, 6 (Témoin, cercle noir). La parasitémie (pourcentage de globule rouge (GR) parasité) a été calculée chaque jour par une coloration au Giemsa des frottis après fixation au méthanol. (A) Cinétique d'infection complète, (B et C) cinétique d'infection des souris sacrifiées au pic de l'infection. Pour l'expérience A quatre souris ont été utilisées dans chacun des groupes et l'expérience a été répétée à 1 seul fois reprises tandis que pour l'expérience B et C quatre souris ont été utilisées dans chacun des groupes et les résultats des deux expériences sont présentés. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

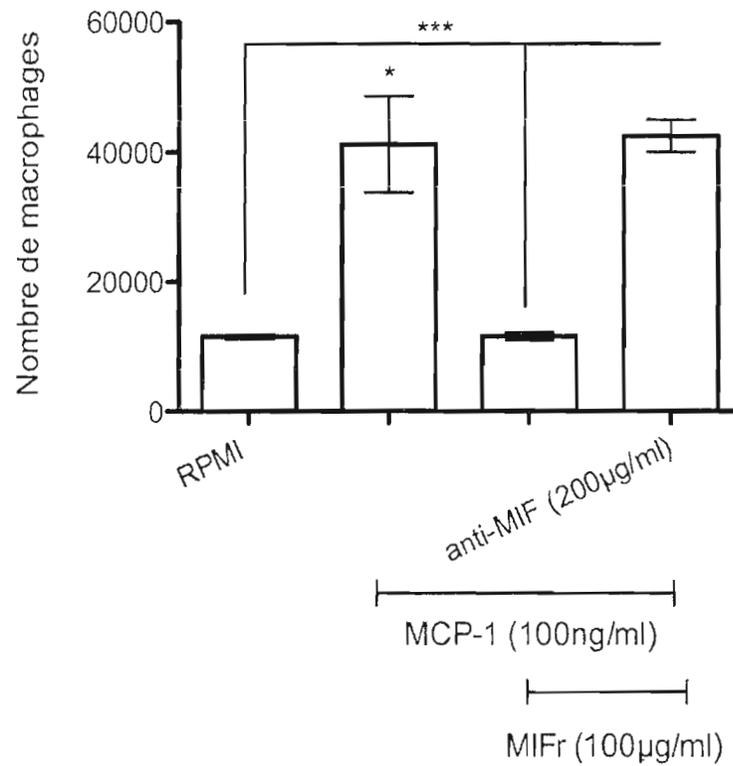


Figure 3,3 : Le test de migration confirme le potentiel neutralisateur de l'anti-MIF. Des macrophages de la moelle osseuse ont été différenciés et mises en cultures (5×10^5 cellules/mL). Afin de stimuler la migration des macrophages du MCP-1 (100ng/mL) a été ajoutée. Une concentration d'anti-MIF (200µg/mL) a été ajoutée afin de vérifier si la neutralisation avec bien lieu. Le test représente de triplicata et l'analyse statistique a utilisé un t-test non paramétrique two-tailed. * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$.

3.3 Le MIF régule l'anémie et l'érythropoïèse lors de l'infection par *Plasmodium chabaudi adami* DK.

Lors de l'infection par *Plasmodium*, qui se déroule dans les érythrocytes, le parasite cause la lyse des érythrocytes, ce qui permet la libération des mérozoïtes et la progression de la parasitémie. Une anémie hémolytique plus ou moins sévère se produit et afin de compenser la perte des érythrocytes, une production accrue de différents précurseurs érythropoïétiques a lieu. Il a déjà été démontré que lors que le MIF était neutralisé ou éliminé, une augmentation de l'érythropoïèse était observée, mais seulement de manière *in vitro* (McDevitt et al., 2006). Nous avons donc voulu voir si une neutralisation *in vivo* du MIF allait produire le même effet qu'observé précédemment.

Chez les souris infectées, une augmentation de la production de réticulocytes a été observée à partir du jour 4 post-infection. Chez les souris traitées avec l'anti-MIF et infectées, une diminution de la production de réticulocytes a été, par contre, observée par rapport aux souris infectées, et était significative aux jours 4 et 5 post-infection (Figure 3,4A) (** $p < 0,05$). Le niveau d'Hb a décliné progressivement, tout au long de l'infection, pour atteindre une anémie modérée au pic de l'infection chez les souris infectées et traitées avec le témoin isotypique. Chez les souris traitées, l'anti-MIF prévient la diminution du le niveau d'Hb au pic de l'infection, soit au jour 8, par rapport aux souris témoins (infectées et traitées le témoin isotypique) (Figure 3,4B, * $P < 0,05$).

Plusieurs cytokines inhibent l'hématopoïèse, et il y a des évidences que le MIF inhibe le développement des précurseurs érythropoïétiques *in vitro* (Martiney et al., 2000) par son action stimulatrice d'IFN- γ et le TNF- α , deux cytokines impliquées dans l'induction de l'anémie (Calandra and Roger, 2003). L'effet de la neutralisation du MIF sur l'érythropoïèse *in vivo* lors d'une infection par une souche non virulente de *Plasmodium* a donc été évalué. Pour ce faire, des souris ont été traitées avec l'anti-MIF et infectées comme décrit précédemment. Lors du sacrifice des souris, un marquage avec le TER119, un marqueur spécifique des différentes formes de maturations des érythrocytes, et le CD71, le récepteur de la transferrine, a été effectué chez les cellules de la rate et la moelle osseuse. Afin de

déterminer les différents types de précurseurs, l'expression de TER119 a été subdivisée en se basant sur l'expression du CD71 qui décline progressivement tout au long de la maturation des érythrocytes. Dans la moelle osseuse, aucune différence entre les précurseurs des souris traitées avec l'anti-MIF ou traitées avec le témoin isotypique n'a été observée (Figure 3,4C). Une production comparable des différents précurseurs fut notée chez les cellules spléniques malgré une tendance à la baisse des érythrocytes basophiliques (EryA), et ce, en début d'infection chez les souris traitées par rapport aux témoins (traitées avec le témoin isotypique), mais qui n'est pas statistiquement significative. Un changement dans la production des précurseurs a été observé durant l'évolution de l'infection, caractérisé par une augmentation des érythroblastes orthochromatiques et des réticulocytes chez des souris sacrifiées au pic d'infection en comparaison des souris sacrifiées en début d'infection (Figure 3,4D).

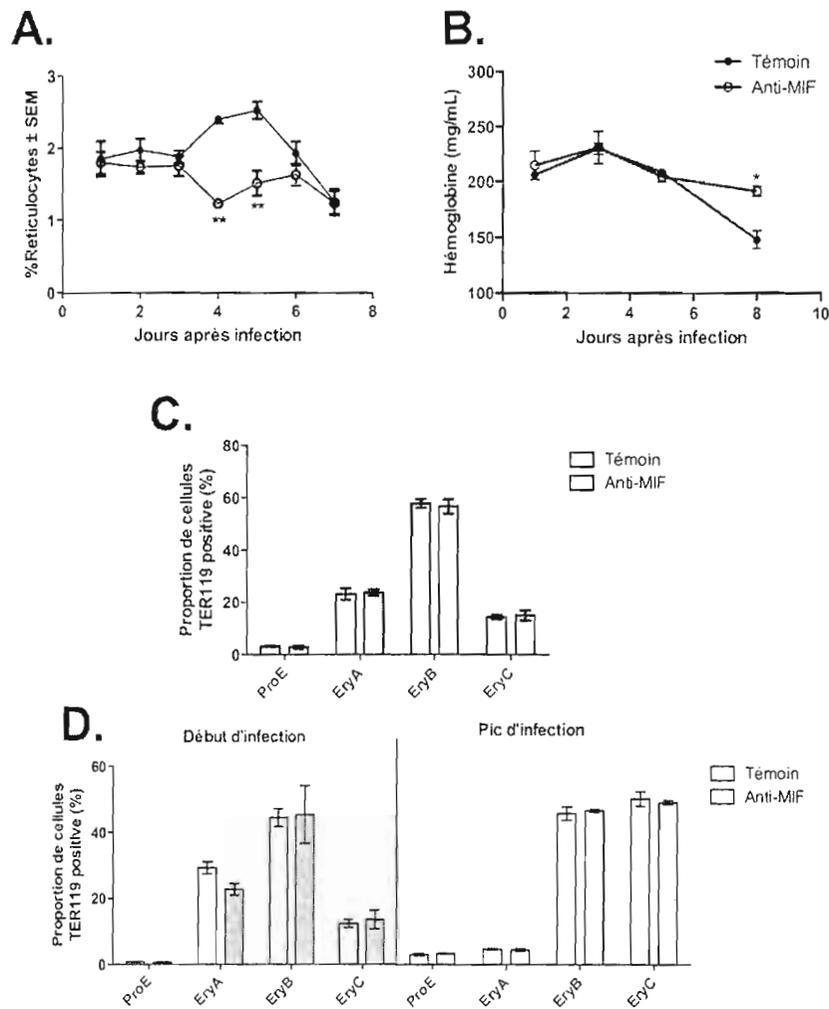


Figure 3,4 : La neutralisation du MIF entraîne une diminution de la réticulocytose et une augmentation de la concentration d'Hb sanguine. Les souris ont été infectées par la voie intraveineuse (i.v) avec 10^5 érythrocytes parasités (souche DK) et ont été traitées (cercle blanc) avec 0,5 mg d'anticorps monoclonal neutralisant anti-MIF aux jours -3, 0, 3 et 6 après l'infection ou avec 0,5 mg d'anticorps isotype contrôle (IgG1) aux jours -3, 0, 3, 6 (Témoin, cercle noir). (A) Suite à l'infection, 2 μ L. de sang furent prélevés chaque jour et un marquage avec l'anti-CD71 (voir démarche méthodologique) a été effectué pour quantifier les réticulocytes jusqu'au pic d'infection. (B) La concentration d'Hb a été déterminée par le réactif de Drabkin (voir démarche méthodologique) tous les deux jours, et ce, jusqu'au pic d'infection. Proportion des différents précurseurs érythropoïétiques provenant des principaux sites d'érythropoïèses soit la moelle osseuse (C) et la rate (D) suite à un marquage avec un anti-CD71 et un anti-TER119 (voir démarche méthodologique). Quatre souris ont été utilisées par groupe et chacune des expériences a été effectuées à deux reprises, et ce, pour chacun des temps d'infection. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$.

3.4 Effet du traitement avec l'anti-MIF sur les cytokines inflammatoires

Pendant les infections par *Plasmodium*, l'hôte produit des cytokines pro-inflammatoires suite à la détection du parasite. Durant les infections, la liaison de l'Hz au TLR-9 et du glycoposphatidylinositol (GPI) aux TLR-2 et/ou TLR-4 stimule la production des cytokines pro-inflammatoires (Gazzinelli et Denkers, 2006). En premier lieu, une réponse pro-inflammatoire est induite, caractérisée par la production d'IL-12, d'IFN- γ , de TNF- α , de MIF et d'autres. La sécrétion d'IL-10 et du TGF- β , principalement suite à l'inflammation se produit afin de contre balancer l'action des cytokines pro-inflammatoires. Dans la prochaine section, nous documentons les changements induits lors de traitements avec l'anti-MIF. Nous avons donc voulu voir comme une infection par *Plasmodium* et une neutralisation du MIF allait influencer la production des cytokines inflammatoires. Une diminution de la production d'IFN- γ et de TNF- α devrait être observé lors de la neutralisation du MIF, et ce, peu importe le moment de l'infection.

3.4.1 La neutralisation de MIF *in vivo* varie les niveaux de production de l'IFN- γ et d'IL-10 lors de l'infection.

Plusieurs cytokines interfèrent avec l'hématopoïèse, et il y a des évidences que le MIF inhibe la croissance *in vitro* des précurseurs en agissant en synergie avec l'IFN- γ et le TNF- α . (Martiney et al., 2000). Afin de vérifier l'effet du MIF sécrété lors d'une infection par une souche non virulente de *Plasmodium*, sur la production d'IFN- γ , des souris ont été traitées avec l'anti-MIF et infectées comme décrit précédemment.

La production d'IFN- γ a été caractérisée au début et au pic de l'infection. Comme le démontre la figure 3,4A, une diminution de la production d'IFN- γ a été constatée en début d'infection chez les souris traitées avec l'anti-MIF par rapport aux souris infectées (* $p < 0,05$). Par contre, au pic de l'infection, une augmentation non statistiquement significative de la production d'IFN- γ chez les souris traitées avec l'anti-MIF a été mesurée par rapport aux témoins (traitées avec le témoin isotypique et infectées) (Figure 3,5A) (* $p < 0,05$). Une dynamique de production comparable d'IL-10 a été mesurée (Figure 3,5B) (* $p < 0,05$). Il

semble que l'ajout d'un anticorps neutralisant le MIF sécrété change la cinétique de production de l'IFN- γ et en conséquence de l'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire qui permet de contrôler l'inflammation. Il est à noter que la production d'IL-10 et d'IFN- γ , au pic de l'infection, sont aussi augmentés lors d'une infection par la souche virulente, mais que cette augmentation n'est pas statistiquement significative (données non montrées).

3.4.2 La neutralisation du MIF *in vivo* augmente la sécrétion de TNF- α durant l'infection

Les cytokines comme l'IFN- γ , le TNF- α , et IL-1 β étaient des candidats idéaux impliqués dans l'anémie lors des infections. L'effet du MIF sécrété sur la production de TNF- α lors de l'infection par une souche non virulente de *Plasmodium* a alors été évalué chez des souris traitées avec l'anti-MIF et infectées.

Au début d'infection, une augmentation significative, de la production accrue de TNF- α a été observée chez les splénocytes totaux des souris traitées avec l'anti-MIF par rapport aux souris traitées avec le témoin isotypique et infectées (Figure 3,6) (* $p < 0,05$). Une augmentation de la production de TNF- α a aussi été observée au pic de l'infection, mais elle n'est pas statistiquement significative. La production de TNF- α est aussi augmentée lors de l'infection par la souche virulente (données non montrées).

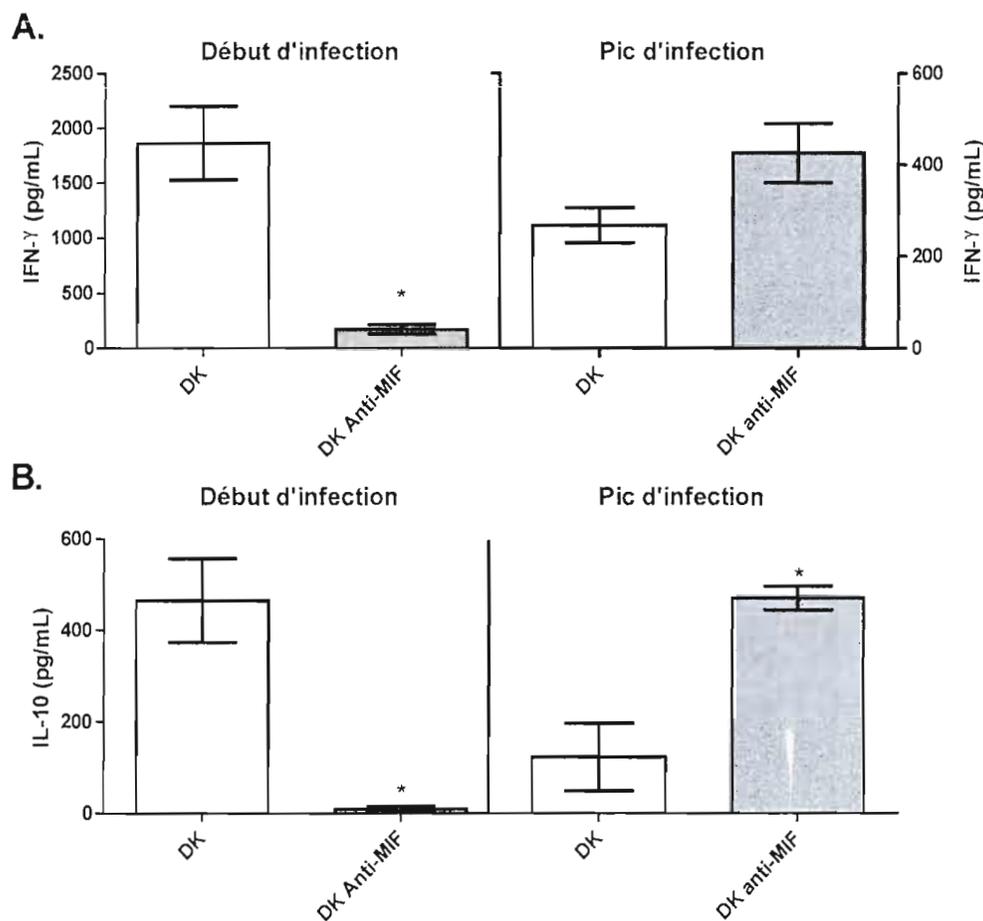


Figure 3,5 : La neutralisation du MIF change le profil de sécrétion d'IFN- γ et d'IL-10. Les concentrations d'IFN- γ (A) et d'IL-10 (B) ont été mesurées après 72 h dans un surnageant de culture des cellules spléniques totales sans stimulation. Une concentration de 2×10^6 cellules/mL a été utilisée. Les histogrammes représentent la moyenne \pm les erreurs standard à la moyenne de 4 souris par groupes. L'expérience a été répétée à deux reprises, et ce pour chacun des temps d'infection. Les analyses statistiques ont utilisé un t-test non paramétrique two-tailed. * $p < 0,05$.

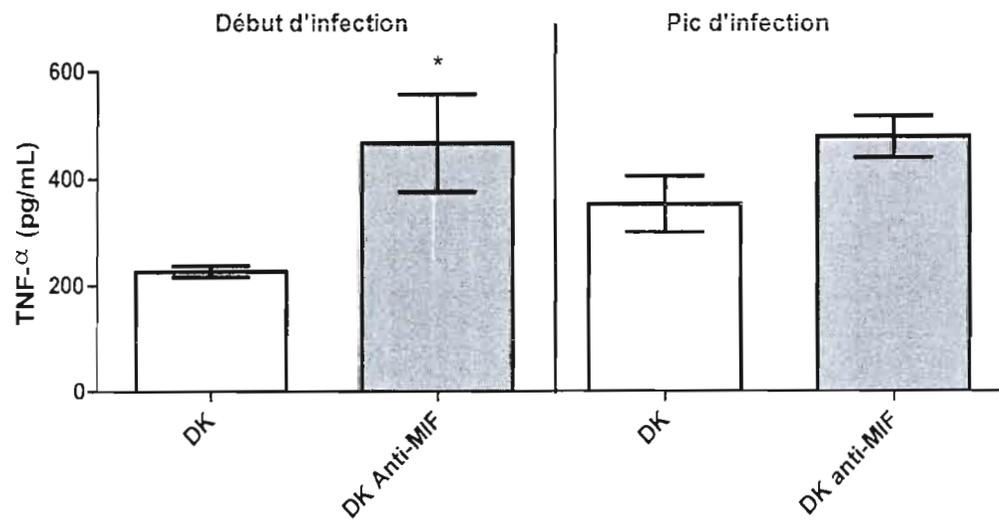


Figure 3,6 : La sécrétion de TNF- α augmente chez les souris traitées avec l'anti-MIF et infectées avec *P. c. adami* DK. La concentration de TNF- α a été mesurée après 72 h dans un surnageant de culture sur des cellules spléniques totales sans stimulation. Une concentration de 2×10^6 cellules/mL a été utilisée. Les histogrammes représentent la moyenne \pm les erreurs standard à la moyenne de 4 souris par groupes. L'expérience a été répétée à deux reprises, et ce pour chacun des temps d'infection. Les analyses statistiques ont utilisé un t-test non paramétrique two-tailed. * $p < 0,05$.

3.4.3 Effet de la neutralisation du MIF sécrété sur la production d'IFN- γ et de TNF- α sur différents types cellulaires, et ce, à différent temps de l'infection.

Afin d'évaluer la contribution de différentes populations cellulaires sur la production d'IFN- γ et de TNF- α , lors de la neutralisation du MIF sécrété, des purifications cellulaires ont été réalisées à partir d'une suspension cellulaire de cellules spléniques, pour évaluer la contribution des cellules spléniques dépourvues des cellules T ou des cellules NK. En début d'infection, une tendance à la diminution de la production d'IFN- γ a été notée chez les cellules spléniques sans cellules T (Figure 3,7A), chez les cellules spléniques sans cellules T et sans cellules NK (Figure 3,7B) et chez les cellules spléniques contenant seulement des cellules NK (Figure 3,7C). Par contre, lors du pic de l'infection, l'effet inverse dans la production d'IFN- γ a été observé, soit une tendance à l'augmentation (Figure 3,7). Aucune augmentation ou diminution observée chez les différents types cellulaires n'est statistiquement significative. La comparaison se fait toujours par rapport à des souris qui ont été traitées avec un témoin isotypique et infectées.

Pour la production de TNF- α , cette cytokine a été quantifiée par ELISA dans le surnageant de culture de splénocytes sans cellules T ou sans cellules NK. Chez les cellules spléniques dépourvues de cellules T (Figure 3,8A) (** $p < 0,01$) et chez les cellules spléniques dépourvues de cellules T et de cellules NK (Figure 3,8B) (* $p < 0,05$), une diminution significative de la production de TNF- α fut observée chez les souris traitées avec l'anti-MIF, et ce, en début d'infection. Par contre, en début d'infection pour les cellules spléniques contenant seulement des cellules NK (Figure 3,7C) et au pic d'infection, aucune différence n'était pas observable dans la production de TNF- α (Figure 3,8).

Les figures 3,7C et 3,8C, en début d'infection, n'ont pas d'écart-type puisque ces résultats représentent le regroupement des 4 souris. Nous avons dû regrouper ces quatre souris puisque la proportions de cellules NK présentes dans une rate est très faible. Des regroupements ne furent pas effectués au pic d'infection, puisque la proportion de cellules NK était plus élevée. Sachant que l'IL-10 peut être produit par les cellules T (Kumar et al., 1998) et les cellules NK (Vigano et al., 2001), et que l'IL-10 peut inhiber la production de

MIF par les cellules T (Wu et al., 1993), il aurait été intéressant de voir si le MIF avait une influence sur la production IL-10 chez les types cellulaires examinés.

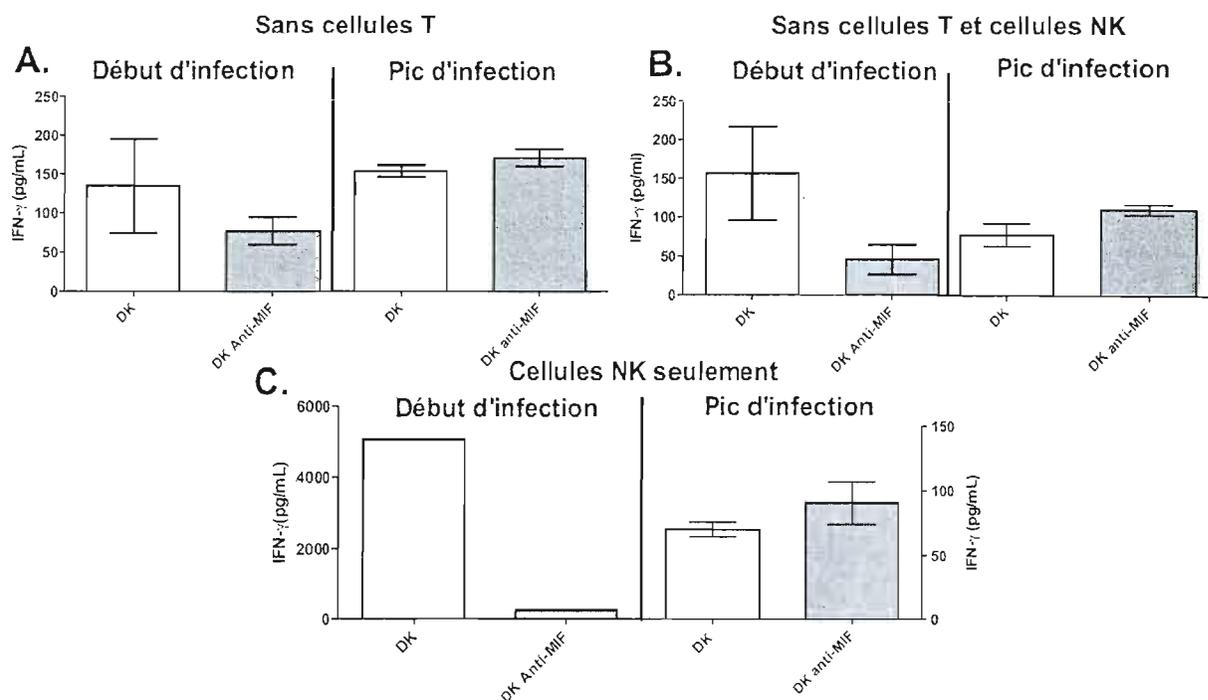


Figure 3,7 : Effet de la neutralisation du MIF sécrété sur la production d'IFN- γ chez différents types cellulaires, en début d'infection et au pic d'infection. La concentration d'IFN- γ a été mesurée après 72 h dans un surnageant de culture sur des cellules spléniques dépourvues de cellules T (A), dépourvues de cellules T et de cellules NK (B) et contenant seulement des cellules NK (C), et ce, sans stimulation. Une concentration de 2×10^6 cellules/mL a été utilisée. Les histogrammes représentent la moyenne \pm les erreurs standard à la moyenne de 4 souris par groupes. L'expérience a été répétée à deux reprises, et ce pour chacun des temps d'infection. Les analyses statistiques ont utilisé un t-test non paramétrique two-tailed.

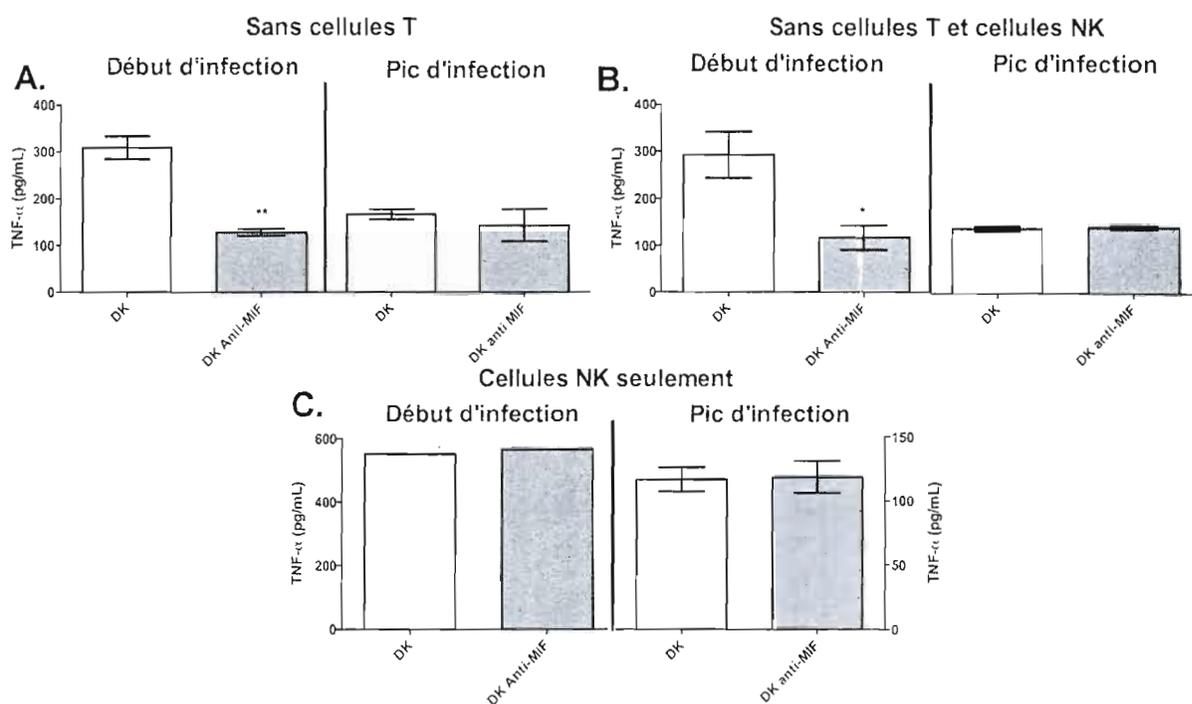


Figure 3,8 : Effet de la neutralisation du MIF sécrété sur la production de TNF- α chez différents types cellulaires, en début d'infection et au pic d'infection. La concentration de TNF- α a été mesurée après 72 h dans un surnageant de culture sur des cellules spléniques dépourvues de cellules T (A), dépourvues de cellules T et de cellules NK (B) et contenant seulement des cellules NK (C), et ce, sans stimulation. Une concentration de 2×10^6 cellules/mL a été utilisée. Les histogrammes représentent la moyenne \pm les erreurs standard à la moyenne de 4 souris par groupes. L'expérience a été répétée à deux reprises, et ce pour chacun des temps d'infection. Les analyses statistiques ont utilisé un t-test non paramétrique two-tailed. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

3.5 Effet d'un prétraitement avec de l'Hz sur la parasitémie et la réticulocytose lors d'une infection par *P. c. adami* DK

L'hémozoïne induit la sécrétion de MIF *in vitro* (Martiney et al., 2000; Calandra et Roger, 2003). Nous avons voulu évalué si un prétraitement *in vivo* avec de l'Hz synthétique affectait la sécrétion de MIF, la parasitémie et la production de réticulocytes.

3.5.1 Augmentation de la sécrétion de MIF lors d'un prétraitement avec l'Hz succédé d'une infection avec *Plasmodium chabaudi adami* DK

Pour ce faire, un traitement avec de l'Hz synthétique (fournit par le Dr. Martin Olivier, Université McGill), soit deux doses de 1mg/100µL de PBS, par la voie intraveineuse, ont été effectuées, chez des souris BALB/c, avec une semaine d'intervalle. Une semaine après le deuxième traitement avec l'Hz, l'infection, par la voie intrapéritonéale, avec la souche DK de *P. c. adami* a été effectuée. La détection du MIF a été effectuée par immunobuvardage grâce à un anticorps polyclonal anti-MIF. La figure 3,9A démontre qualitativement la présence de MIF sérique chez les souris traitées ainsi que traitées et infectées, par rapport aux souris témoins. Une sécrétion accrue de MIF s'est produite lorsque les souris étaient traitées avec l'Hz et par la suite infectées par rapport aux souris traitées avec de l'Hz ou infectées en absence de traitement avec de l'Hz. L'expression de MIF dans le sérum de souris infectées par la souche DK était plus faible dans cette analyse (Fig. 3.9A), résultat que suggère de niveaux de sécrétion de MIF varient d'expérience en expérience (voir Figure 3.1).

3.5.2 Effet d'une augmentation de la sécrétion du MIF sur la parasitémie et la réticulocytose lors d'une infection.

Lors d'un prétraitement avec de l'Hz, une augmentation de la parasitémie a été constatée au pic d'infection (Figure 3,9B) (*p<0,05). Une diminution dans la production des réticulocytes au jour 10, soit après le pic d'infection, a été observée chez les souris ayant reçu un prétraitement avec de l'Hz (Figure 3,9C) (*p<0.05). Durant tout le reste de l'infection, le

pourcentage de réticulocytes est resté comparable entre les souris témoins ou traitées avec de l'HZ.

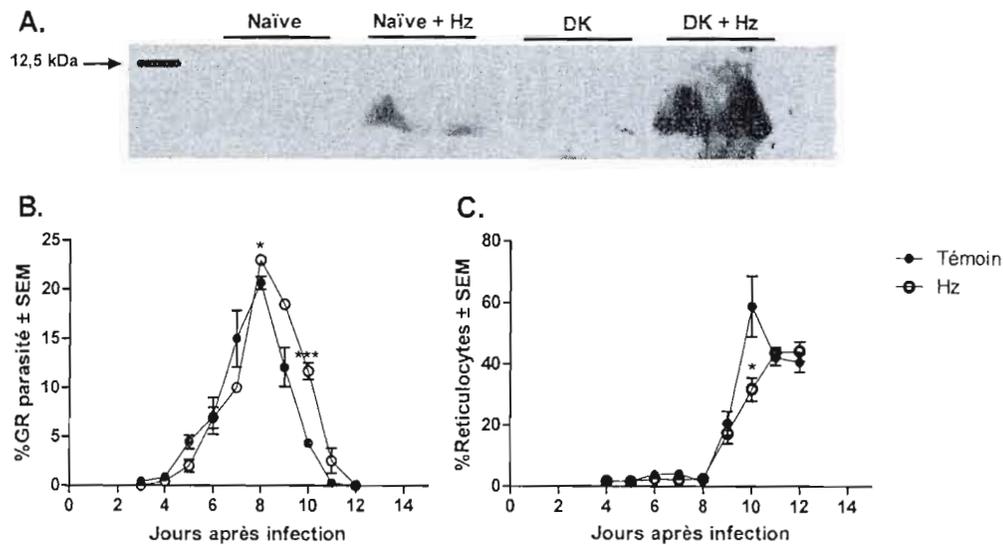


Figure 3,9 : Le prétraitement avec de l'Hz augmente la sécrétion de MIF ainsi que la parasitémie et inhibe la réticulocytose lors d'une infection par *P. c.adami*. (A) Pour chaque expérience, 10 μ L de sérum, prélevés au pic de l'infection, ont été séparés dans un gel de polyacrylamide de 15 % et suivis par immunobuvardage. Un anticorps polyclonal anti-MIF a été utilisé pour la détection de la protéine recherchée. La même quantité d'échantillons a été déposée dans chacun des puits. Représentation d'une expérience qui correspond à trois expériences dont le sérum provient de souris différentes. (B) Cinétique d'infection de souris ayant été traitées avec de l'Hz (voir démarche méthodologique) et infectées par la voie péritonéale (i.p.) avec 10^5 érythrocytes parasités (souche DK). La parasitémie a été calculée chaque jour par une coloration au Giemsa des frottis après fixation au méthanol. (C) Suite à l'infection, 2 μ L de sang furent prélevés chaque jour et un marquage avec anti-CD71 (voir démarche méthodologique) a été effectué pour quantifier les réticulocytes jusqu'au pic d'infection. L'expérience a été fait a deux reprises avec dans chacun des groupes 4 souris. * $p < 0,05$ et *** $p < 0,001$.

CHAPITRE IV

DISCUSSION

La plupart des études sur le MIF et le paludisme ont été réalisées *in vitro* ou avec des souris déficientes en cette cytokine (MIF KO), qui ont démontré que son absence amène à un meilleur contrôle de l'anémie et à la survie de souris (Hernandez-Valladares et al., 2006). Dans la présente recherche, nous avons évalué le rôle du MIF dans la virulence associée à l'infection par *P. c. adami* (DS) en comparant les effets de sa neutralisation sur des infections non-virulentes (souche DK). Nos résultats préliminaires démontrent que le MIF n'est pas responsable de la virulence de *P.c. adami* DS. Par contre, cette étude nous a permis d'identifier des effets régulateurs jamais reportés pour le MIF durant l'infection non virulente par *P.c. adami* DK. En effet, puisque le MIF induit la sécrétion du TNF- α (Nakamaru et al., 2005) et de l'IFN- γ , deux cytokines impliquées dans l'anémie, nous avons analysé l'impact de la neutralisation du MIF sur leur production. Nous avons aussi suivi la sécrétion d'IL-10, étant donné son rôle dans l'anémie par son action stimulatrice de la translocation de la ferritine dans le système réticuloendothélial, ce qui entraîne une détérioration de la synthèse de l'hème (Tilg et al., 2002). L'IL-10 est aussi une des principales cytokines anti-inflammatoires, et donc joue un rôle important dans le contrôle de l'inflammation. L'interleukine-10 va supprimer l'inflammation en utilisant plusieurs voies incluant une diminution de la production d'IL-1 α/β , de TNF- α , d'IL-8 ainsi que des radicaux toxiques comme l'oxyde nitrique (Tilg et al., 2002).

Le MIF semble inhiber la cytodifférenciation et de la production d'Hb, et nous avons donc évalué l'effet de sa neutralisation sur l'anémie, en mesurant par cytofluométrie en flux, les populations des précurseurs érythropoïétiques dans la rate et dans la moelle osseuse. Certains paramètres liés à l'anémie, soient la concentration d'Hb sanguine et le pourcentage de réticulocytes, ont été considérés. En dernier lieu, nous avons mesuré la parasitémie, étant

donné que la réponse inflammatoire peut réduire la charge parasitaire et la destruction des érythrocytes par le parasite.

Dans cette étude, plusieurs résultats obtenus ont été surprenants durant l'infection non virulente. En tout premier lieu, une production accrue de TNF- α chez les souris traitées avec l'anti-MIF et infectées par *Plasmodium* a été observé, en comparaison aux souris traitées avec le témoin isotypique et infectées. De plus, une modulation de la production de IL-10 et de l'IFN- γ a été obtenue lors des différents temps d'infection. Ces changements dans la production des cytokines inflammatoires semblent permettre une meilleure résolution de l'infection ainsi qu'une pathologie plus faible (une parasitémie plus faible au pic de l'infection) durant l'infection. Une augmentation dans le niveau d'Hb a été observée chez les souris traitées avec l'anti-MIF et infectées, si on les compare aux souris témoins (traitées avec le témoin isotypique et infectées).

Plusieurs études traitant du MIF ont été réalisées chez des souris déficientes en MIF. La principale observation qui a été obtenue dans ces études est une diminution de l'expression du TLR-4 ce qui entraîne une chute dans la production du TNF- α (Reyes et al., 2006), par un mécanisme dépendant de la phosphorylation d'ERK1/2 qui est de plus courte durée lors de la neutralisation du MIF (Leng et Bucala, 2006). Par contre, il semble que la neutralisation du MIF permet une activation plus longue de la voie P38 MAPK (Toh et al., 2006) qui en présence de TNF- α induit la production de celle-ci.

Contrairement à ce qu'attendue, la neutralisation du MIF a amené à une production accrue de TNF- α au début et au pic d'infection. Le TNF- α est une cytokine pro-inflammatoire, principalement sécrétée par les monocytes/macrophages en réponse à plusieurs produits parasitaires. Lors d'une infection par *Plasmodium* le TNF- α n'induit pas la destruction du parasite, mais protège en activant des facteurs antiparasitaires pro-inflammatoires sur une variété de cellules effectrices (Perlmann et Troye-Blomberg, 2002). La hausse dans la sécrétion de TNF- α suite à la neutralisation du MIF était inattendue, puisque dans la littérature la neutralisation du MIF entraîne une diminution de la production de TNF- α . Dans ce contexte de neutralisation du MIF, une diminution de l'expression des TLR-4 a été décrite, et l'ajout LPS, le principal ligand du TLR-4, se traduit par une chute dans la production de

TNF- α (Roger et al., 2001; Calandra et Roger, 2003). Dans une étude avec des souris déficientes en MIF, une diminution de TNF- α chez les souris déficientes par rapport aux souris de type sauvage infectées avec *Trypanosoma cruzi* a été rapportée (Reyes et al., 2006).

Plusieurs mécanismes peuvent expliquer les résultats obtenus concernant le TNF- α . D'une part, il a été démontré que le MIF amène à une phosphorylation soutenue (d'environ 24h) au lieu de transitoire (environ 90 minutes) de la voie de signalisation ERK1/2 (Leng et Bucala, 2006). La neutralisation du MIF, par une molécule inhibitrice ou par un anticorps, engendre une inhibition de la phosphorylation d'ERK1/2, ce qui diminue la production des cytokines pro-inflammatoires (Leng et Bucala, 2006). Par contre, il semble que la voie de signalisation p38 MAPK, qui régule la production de TNF- α (Campbell et al., 2004; Toh et al., 2006), reste activée plus longtemps chez les souris déficientes en MIF, et ce, en présence de TNF- α (Toh et al., 2006). Le TNF- α permet la phosphorylation de la voie p38 MAPK, et la neutralisation du MIF permet une phosphorylation qui perdure davantage, ce qui pourrait expliquer la hausse dans la production de TNF- α lors de la neutralisation du MIF (Toh et al., 2006). Lors des infections par *Plasmodium*, l'Hz induit la phosphorylation d'ERK1/2 (Jaramillo et al., 2003; Akman-Anderson et al., 2007). Cette phosphorylation accrue de p38 MAPK, par le TNF- α , et l'augmentation de la phosphorylation d'ERK1/2 par l'Hz, pourraient expliquer la hausse dans la production de TNF- α . Nous émettons l'hypothèse que l'augmentation de la production de TNF- α observée, lors de la neutralisation aux différents moments de l'infection, serait causée par une phosphorylation plus intense et soutenue de la voie p38 MAPK.

D'autre part, il a été démontré que le MIF module l'expression des TLR, principalement le TLR-4. L'inhibition de MIF par un vecteur MIF anti-sens ou par traitement avec un anticorps neutralisant amène à une chute de l'expression du TLR-4, autant au niveau de l'expression cellulaire qu'au niveau de son ARNm chez les macrophages; l'expression de l'ARNm du TLR-2 ne subit aucune modification (Roger et al., 2001). Durant l'immunité innée, les TLR sont impliqués dans la production de cytokines inflammatoires. L'Hz et les motifs CpG non-méthylé se lient au TLR-9, tandis que le GPI va se lier au TLR-2 et au TLR-4. Le GPI provenant du parasite, libéré lors de la lyse des érythrocytes parasités, induit la production des cytokines pro-inflammatoires par sa liaison avec le TLR-2 et le TLR-4

(Franklin et al., 2007; Langhorne et al., 2008). Le GPI induit la production de TNF- α par sa liaison avec l'hétérodimère TLR-1/2, et il semblerait que le TLR-4 a seulement une contribution mineure (Gazzinelli et Denkers, 2006). De plus, le traitement avec un inhibiteur spécifique du MIF intracellulaire (ISO-1) a montré que la production de TNF- α par le TLR-2 reste identique ou légèrement augmentée, et ce, lors d'une stimulation par un agoniste du TLR-2 (West et al., 2008). Durant l'infection par *Plasmodium*, l'expression de TLR-2 et TLR-4 augmente (Loharungsikul et al., 2008), ce qui suggère que la hausse TNF- α observée lors de la neutralisation du MIF, au début et au pic d'infection, peut être un résultat de la liaison du GPI au TLR-2 qui induit la production de TNF- α par les cellules dendritiques et les macrophages. En ce qui concerne le TLR-4, l'infection aurait une tendance à augmenter son expression, et la neutralisation de MIF à sa diminution. Comme nous n'avons pas examiné l'expression de TLR-4 lors de cette expérimentation, il nous est donc impossible de conclure quoi que ce soit à propos de leur implication. Le GPI en plus de se lier au TLR-2, peut se lier à un récepteur aux mannoses, ce qui stimule la production de TNF- α par les macrophages (Vijaykumar et al., 2001).

Une augmentation de la production de TNF- α s'est produite en début d'infection due à sa sécrétion par des splénocytes totaux. Lors de l'élimination des cellules T (CD90+) la production de TNF- α a diminué de façon significative, ce qui suggère que les cellules T sont la source de TNF- α . Chez les souris infectées et traitées avec un témoin isotypique (témoin), les cellules T ne sont pas sécrétrices de TNF- α . La production de TNF- α par les cellules T est un fait surprenant puisque lors de la neutralisation du MIF, une diminution de l'activation des cellules T, par les cellules présentatrices d'antigènes ou des antigènes, est souvent observée (Santos et al., 2008). Des résultats préliminaires, dans notre laboratoire, suggèrent que la neutralisation du MIF augmente la viabilité et la prolifération des cellules T CD4⁺ activées par la Concanavaline A (données non montrées).

La réduction de la parasitémie chez les souris traitées avec l'anticorps anti-MIF peut être attribuable à l'augmentation du TNF- α . En effet, lors de l'infection par *P. c. adami* DS chez des souris déficientes en TNF, une parasitémie plus forte est mesurée (Hernandez-Valladares et al., 2006). L'augmentation de TNF- α permet une meilleure réponse précoce. une plus grande génération d'espèce réactive de l'oxygène ainsi qu'une meilleure réponse immune ce

qui pourrait expliquer la diminution de la parasitémie et de l'anémie (Hernandez-Valladares et al., 2006).

Par rapport à l'IFN- γ et à l'IL-10, une diminution de leur sécrétion est observée en début d'infection et est suivie d'une augmentation au pic de l'infection. Les principaux types cellulaires producteurs d'IFN- γ durant le paludisme sont les cellules NK et les lymphocytes T. Tout comme dans l'étude de Reyes *et al* (2006), il semble que la neutralisation du MIF engendre une activation déficiente des cellules NK, ce qui expliquerait pourquoi une inhibition de la production d'IFN- γ soit observée en début d'infection. L'analyse de la fraction cellulaire contenant seulement des cellules NK confirme cette hypothèse, puisqu'une diminution de la production d'IFN- γ était observée chez les cellules NK provenant de souris traitées avec l'anti-MIF.

La production accrue d'IFN- γ , au pic d'infection, chez des souris traitées, serait due à un autre type cellulaire que les cellules T, puisque leur élimination augmente la production de l'IFN- γ *in vitro*. L'IL-10 est produit principalement par les cellules T, autant les T_H1 que les T_H2 , par les cellules B, par les cellules dendritiques et par les macrophages (Mehrotra et al., 1998; O'Garra et Vieira, 2007; Couper et al., 2008). Comme une inhibition presque totale de sa production est observée, il serait surprenant que ce soit un seul type cellulaire qui soit impliqué dans cette inhibition. Il semblerait que la neutralisation du MIF permet un meilleur contrôle de l'inflammation, ce qui expliquerait pourquoi peu d'IL-10 et IFN- γ ont été produits en début d'infection (Couper et al., 2008).

La production d'IL-10 par les macrophages et les cellules dendritiques est induite principalement par la stimulation de TLR-4, qui est stimulée par le GPI parasite. (Yanagawa et Onoe, 2007). Étant donné que la neutralisation du MIF diminue l'expression du TLR-4 à la surface des macrophages, la diminution de la production d'IL-10 en début d'infection pourrait être imputable à une plus faible expression des TLR-4. Ce même effet pourrait expliquer la chute dans la production d'IFN- γ au début d'infection. Par contre, au pic de l'infection, les macrophages et les cellules dendritiques ne seraient plus responsables de la production d'IFN- γ et d'IL-10. De récents résultats semblent indiquer une production accrue d'IFN- γ par les cellules T $CD4^+$, au pic d'infection, suite à la neutralisation du MIF, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de la production chez les souris traitées en comparaison

des souris témoins. Il se pourrait que les cellules T CD4⁺ soient aussi responsables de la hausse d'IL-10 par les souris traitées et infectées au pic d'infection.

La neutralisation du MIF n'a pas entraîné de différence significative des précurseurs érythropoïétiques de la rate et la moelle osseuse; une légère diminution des précurseurs plus précoces a été observée dans la rate, qui est l'un des organes majeurs dans l'érythropoïèse lors des infections par *Plasmodium* murin (Villeva et al., 1990). Dans la moelle osseuse, une production d'érythroblaste comparable a été observée chez les souris traitées avec l'anti-MIF et infectées ainsi que chez les souris traitées avec le témoin isotypique et infectées. Il a été démontré qu'une augmentation de la production des BFU-E, des CFU-E et des érythroblastes dans la rate lors des infections par *Plasmodium* (Villeva et al., 1990). Lors des infections par *Plasmodium*, la réponse érythropoïétique a lieu presque exclusivement dans la rate, ce qui explique pourquoi aucune différence ne fut observée dans la moelle osseuse lors du traitement avec l'anti-MIF.

Dans les cellules spléniques, une tendance à l'augmentation des érythroblastes orthochromatiques et des réticulocytes a été remarquée au pic d'infection par rapport au début d'infection. Pour ce qui est de l'anémie, une concentration d'Hb plus élevée a été mesurée au pic de l'infection chez les souris ayant reçues un traitement avec l'anti-MIF. De plus, une production plus faible de réticulocyte a été notée aux jours 4 et 5 post-infection chez les souris traitées.

Lors d'une infection par *P. c. adami* DK, une anémie modérée est induite au pic de l'infection (Cambos et al., 2008). Plusieurs cytokines ont été pressenties pour avoir une action sur l'anémie hémolytique. Le TNF- α , l'IFN- γ et l'IL-1 β ont été les premières à être identifiées, mais de récentes études démontrent qu'elles ont un faible impact sur l'induction de l'anémie (Yap et Stevenson, 1994). De récentes recherches ont montré que le MIF inhibe l'érythropoïèse de plusieurs façons: diminution de la production des précurseurs érythropoïétiques, de la quantité d'Hb produite et de la cytodifférenciation (Martiney et al., 2000; McDevitt et al., 2006). Il est donc possible qu'une anémie plus faible soit observée chez les souris traitées avec l'anti-MIF, puisque la neutralisation du MIF sécrété engendre une augmentation de l'Hb. Aussi, la hausse de la concentration d'Hb pourrait être due à une plus faible parasitémie chez les souris traitées avec l'anti-MIF. Il a été démontré qu'une

production élevée de TNF- α induit l'apoptose des cellules hématopoïétiques, par la voie extrinsèque. C'est en se liant au TNFR1 (p55) et au TNFR2 (p75) que le TNF- α induit l'apoptose par l'action des caspases (Casals-Pascual et al., 2006; Xu and Shi, 2007). Le TNF- α est capable d'induire l'apoptose des précurseurs érythropoïétiques (Chang et Stevenson, 2004a). Des études ont démontré que le TNF- α , en concentration élevée, activerait l'apoptose des BFU-E *in vitro* (Rusten et Jacobsen, 1995; Petrache et al., 2000). Nos résultats indiquent que chez les souris traitées avec l'anti-MIF une augmentation de l'apoptose est observée chez les splénocytes totaux (données non montrées). La production accrue de TNF- α et l'augmentation de l'apoptose peuvent expliquer pourquoi une diminution de la production chez les proérythroblastes (proE) et chez les érythrocytes basophiliques précoces (EryA) est observée en début d'infection. Il n'a pas été démontré que le TNF- α inhibe les proE et EryA, mais comme il induit l'apoptose des BFU-E, qui sont les précurseurs les plus précoces, il pourrait ainsi amener à une diminution des précurseurs plus tardifs, tel qu'observé.

Plusieurs molécules parasitaires peuvent induire la production du MIF, entre autres l'Hz (McDevitt et al., 2006; Coban et al., 2007). Il a été suggéré l'Hz se lie au TLR-9, elle pourrait induire une voie de signalisation dépendante du MyD88 qui permet la production de MIF (Akira, 2006). Nous avons confirmé le fait que l'Hz induisait la production de MIF, indépendamment de la présence d'infection, en faisant un prétraitement avec de l'Hz et nous avons reporté qu'une production accrue de MIF sérique chez les souris naïves et infectées ayant reçues un prétraitement avec de l'Hz. Le niveau de production du MIF semble influencer la parasitémie, puisqu'une neutralisation du MIF entraîne une diminution de la parasitémie et qu'une production accrue (traitement par l'Hz) engendre une parasitémie plus forte. Cette modulation fut observée chez des souris déficientes en MIF et lors d'une infection par *Trypanosoma cruzi*, ou une parasitémie plus faible fut observée (Reyes et al., 2006).

Conclusion

En résumé, la neutralisation du MIF change le profil de production du TNF- α , de l'IFN- γ et de l'IL-10 ce qui favorise la résolution de l'infection. En effet, la diminution de l'anémie et de la parasitémie au pic de l'infection, suggère qu'une réponse précoce d'IFN- γ n'est pas protectrice, mais qu'au contraire elle peut stimuler d'avantage la production d'IL-10 et la

suppression de la réponse T_H1 , comme lors d'une infection sans traitement anti-MIF. Une forte production de $TNF-\alpha$, amène à son tour à une parasitémie plus faible et une production d'Hb plus élevée, mais engendre une augmentation de l'apoptose des précurseurs érythropoïétiques, ce qui pourrait expliquer la baisse de réticulocytes observée en début d'infection.

Le principal impact de la neutralisation du MIF sur le paludisme est une diminution de la charge parasitaire, ce qui permet un niveau d'Hb plus élevé. Cette diminution de la charge parasitaire semble est due à une augmentation du $TNF-\alpha$ tout au long de l'infection, en lien avec une diminution d'IL-10 et de l'IFN- γ , en début d'infection qui est suivit d'une augmentation lors du pic de l'infection. De plus, ces résultats nous permettent de mieux comprendre les mécanismes causant l'anémie lors d'une infection par *Plasmodium* et par le fait même la pathophysiologie de cette maladie.

La poursuite de cette recherche sera de comprendre quels types cellulaires sont responsables de l'augmentation du $TNF-\alpha$ et de la modulation de la production de l'IL-10 et de l'IFN- γ lors de l'infection. Il faudra aussi voir si une neutralisation *in vivo* du MIF sécrété aura le même effet sur l'expression des différents TLRs impliqués lors d'une infection par *Plasmodium* ainsi que sur les voies de signalisation des TLRs qui sont impliquées.

RÉFÉRENCES

- Abe, R., Peng, T., Sailors, J., Bucala, R., Metz, C.N., 2001. Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor. *Journal of Immunology* 166, 747-753.
- Akira, S., 2006. TLR signaling. *Current topics in microbiology and immunology* 311, 1-16.
- Akman-Anderson, L., Olivier, M., Luckhart, S., 2007. Induction of nitric oxide synthase and activation of signaling proteins in *Anopheles* mosquitoes by the malaria pigment, hemozoin. *Infection and immunity* 75, 4012-4019.
- Amin, M.A., Volpert, O.V., Woods, J.M., Kumar, P., Harlow, L.A., Koch, A.E., 2003. Migration inhibitory factor mediates angiogenesis via mitogen-activated protein kinase and phosphatidylinositol kinase. *Circulation research* 93, 321-329.
- Apte, R.S., Sinha, D., Mayhew, E., Wistow, G.J., Niederkorn, J.Y., 1998. Cutting edge: role of macrophage migration inhibitory factor in inhibiting NK cell activity and preserving immune privilege. *Journal of Immunology* 160, 5693-5696.
- Arcuri, F., Cintonino, M., Carducci, A., Papa, S., Riparbelli, M.G., Mangioni, S., Di Blasio, A.M., Tosi, P., Vigano, P., 2006. Human decidual natural killer cells as a source and target of macrophage migration inhibitory factor. *Reproduction (Cambridge, England)* 131, 175-182.
- Artavanis-Tsakonas, K., Riley, E.M., 2002. Innate immune response to malaria: rapid induction of IFN-gamma from human NK cells by live *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Journal of Immunology* 169, 2956-2963.
- Augustijn, K.D., Kleemann, R., Thompson, J., Kooistra, T., Crawford, C.E., Reece, S.E., Pain, A., Siebum, A.H., Janse, C.J., Waters, A.P., 2006. Functional characterization of the *Plasmodium* homologue of Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF). *Infection and Immunity* 75, 1116-1128.
- Awandare, G.A., Hittner, J.B., Kremsner, P.G., Ochiel, D.O., Keller, C.C., Weinberg, J.B., Clark, I.A., Perkins, D.J., 2006. Decreased circulating macrophage migration inhibitory factor (MIF) protein and blood mononuclear cell MIF transcripts in children with *Plasmodium falciparum* malaria. *Clinical Immunology* 119, 219-225.
- Baratin, M., Roetynck, S., Lepolard, C., Falk, C., Sawadogo, S., Uematsu, S., Akira, S., Ryffel, B., Tiraby, J.G., Alexopoulou, L., Kirschning, C.J., Gysin, J., Vivier, E., Ugolini, S., 2005. Natural killer cell and macrophage cooperation in MyD88-dependent innate responses to *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 14747-14752.
- Baugh, J.A., Bucala, R., 2002. Macrophage migration inhibitory factor. *Critical Care Medicine* 30, S27-S35.
- Bernhagen, J., Calandra, T., Bucala, R., 1998. Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. *Journal of Molecular Medicine* 76, 151-161.
- Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R.A., Bucala, R., 1994. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *Journal of Experimental Medicine* 179, 1895-1902.
- Calandra, T., Roger, T., 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature Review of Immunology* 3, 791-800.

- Cambos, M., Belanger, B., Jacques, A., Roulet, A., Scorza, T., 2008. Natural regulatory (CD4(+)CD25(+)FOXP(+)) T cells control the production of pro-inflammatory cytokines during *Plasmodium chabaudi* adami infection and do not contribute to immune evasion. *International Journal for Parasitology* 38, 229-238.
- Campbell, J., Ciesielski, C.J., Hunt, A.E., Horwood, N.J., Beech, J.T., Hayes, L.A., Denys, A., Feldmann, M., Brennan, F.M., Foxwell, B.M., 2004. A novel mechanism for TNF-alpha regulation by p38 MAPK: involvement of NF-kappa B with implications for therapy in rheumatoid arthritis. *Journal of Immunology* 173, 6928-6937.
- Casals-Pascual, C., Kai, O., Cheung, J.O., Williams, S., Lowe, B., Nyanoti, M., Williams, T.N., Maitland, K., Molyneux, M., Newton, C.R., Peshu, N., Watt, S.M., Roberts, D.J., 2006. Suppression of erythropoiesis in malarial anemia is associated with hemozoin in vitro and in vivo. *Blood* 108, 2569-2577.
- Chang, K.H., Stevenson, M.M., 2004a. Malarial anaemia: mechanisms and implications of insufficient erythropoiesis during blood-stage malaria. *Int J Parasitol* 34, 1501-1516.
- Chang, K.H., Stevenson, M.M., 2004b. Effect of anemia and renal cytokine production on erythropoietin production during blood-stage malaria. *Kidney International* 65, 1640-1646.
- Chang, K.H., Tam, M., Stevenson, M.M., 2004. Inappropriately low reticulocytosis in severe malarial anemia correlates with suppression in the development of late erythroid precursors. *Blood* 103, 3727-3735.
- Clark, I., Awburn, M., 2002. Migration inhibitory factor in the cerebral and systemic endothelium in sepsis and malaria. *Critical Care Medicine* 30, S263-267.
- Clark, I.A., Cowden, W.B., 2003. The pathophysiology of falciparum malaria. *Pharmacology & therapeutics* 99, 221-260.
- Clark, I.A., Budd, A.C., Alleva, L.M., Cowden, W.B., 2006. Human malarial disease: a consequence of inflammatory cytokine release. *Malaria Journal* 5, 85.
- Coban, C., Ishii, K.J., Kawai, T., Hemmi, H., Sato, S., Uematsu, S., Yamamoto, M., Takeuchi, O., Itagaki, S., Kumar, N., Horii, T., Akira, S., 2005. Toll-like receptor 9 mediates innate immune activation by the malaria pigment hemozoin. *The Journal of experimental medicine* 201, 19-25.
- Coban, C., Ishii, K.J., Horii, T., Akira, S., 2007. Manipulation of host innate immune responses by the malaria parasite. *Trends in Microbiology* 15, 271-278.
- Cordery, D.V., Kishore, U., Kyes, S., Shafi, M.J., Watkins, K.R., Williams, T.N., Marsh, K., Urban, B.C., 2007. Characterization of a *Plasmodium falciparum* macrophage-migration inhibitory factor homologue. *The Journal of infectious diseases* 195, 905-912.
- Couper, K.N., Blount, D.G., Riley, E.M., 2008. IL-10: the master regulator of immunity to infection. *Journal of Immunology* 180, 5771-5777.
- Cui, F., Raymond, M., Qiao, C.L., 2006. Insecticide resistance in vector mosquitoes in China. *Pest Management Science* 62, 1013-1022.
- Cunha-Rodrigues, M., Prudencio, M., Mota, M.M., Haas, W., 2006. Antimalarial drugs - host targets (re)visited. *Biotechnology Journal* 1, 321-332.
- Di Santo, J.P., 2006. Natural killer cell developmental pathways: a question of balance. *Annual review of immunology* 24, 257-286.
- Di Santo, J.P., Vosshenrich, C.A., 2006. Bone marrow versus thymic pathways of natural killer cell development. *Immunological reviews* 214, 35-46.

- Dondorp, A.M., Omodeo-Sale, F., Chotivanich, K., Taramelli, D., White, N.J., 2003. Oxidative stress and rheology in severe malaria. *Redox report : communications in free radical research* 8, 292-294.
- Dzikowski, R., Templeton, T.J., Deitsch, K., 2006. Variant antigen gene expression in malaria. *Cellular microbiology* 8, 1371-1381.
- Eugui, E.M., Allison, A.C., 1980. Differences in susceptibility of various mouse strains to haemoprotozoan infections: possible correlation with natural killer activity. *Parasite Immunology* 2, 277-292.
- Evans, K.J., Hansen, D.S., van Rooijen, N., Buckingham, L.A., Schofield, L., 2006. Severe malarial anemia of low parasite burden in rodent models results from accelerated clearance of uninfected erythrocytes. *Blood* 107, 1192-1199.
- Fernandes, A.A., Carvalho, L.J., Zanini, G.M., Ventura, A.M., Souza, J.M., Cotias, P.M., Silva-Filho, I.L., Daniel-Ribeiro, C.T., 2008. Similar cytokine responses and degrees of anemia in patients with *Plasmodium falciparum* and *Plasmodium vivax* infections in the Brazilian Amazon region. *Clinical Vaccine Immunology* 15, 650-658.
- Flieger, O., Engling, A., Bucala, R., Lue, H., Nickel, W., Bernhagen, J., 2003. Regulated secretion of macrophage migration inhibitory factor is mediated by a non-classical pathway involving an ABC transporter. *FEBS letters* 551, 78-86.
- Fox, J.C.e.a., 1984. *Laboratory Animal Medicine*. Academic Press.
- Franklin, B.S., Rodrigues, S.O., Antonelli, L.R., Oliveira, R.V., Goncalves, A.M., Sales-Junior, P.A., Valente, E.P., Alvarez-Leite, J.I., Ropert, C., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T., 2007. MyD88-dependent activation of dendritic cells and CD4(+) T lymphocytes mediates symptoms, but is not required for the immunological control of parasites during rodent malaria. *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 9, 881-890.
- Gando, S., Nishihira, J., Kobayashi, S., Morimoto, Y., Nanzaki, S., Kemmotsu, O., 2001. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of systemic inflammatory response syndrome. *Intensive Care Medicine* 27, 1187-1193.
- Gazzinelli, R.T., Denkers, E.Y., 2006. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nature Reviews* 6, 895-906.
- Goldsby, R.A., Goldsby, R.A., 2003a. *Immunology*. W.H. Freeman, New York.
- Goldsby, R.A., Goldsby, R.A., 2003b. *Immunology*. W.H. Freeman, New York.
- Hayakawa, Y., Huntington, N.D., Nutt, S.L., Smyth, M.J., 2006. Functional subsets of mouse natural killer cells. *Immunological Reviews* 214, 47-55.
- Hayakawa, Y., Smyth, M.J., 2006. CD27 dissects mature NK cells into two subsets with distinct responsiveness and migratory capacity. *Journal of Immunology* 176, 1517-1524.
- Hernandez-Valladares, M., Naessens, J., Musoke, A.J., Sekikawa, K., Rihet, P., Ole-Moiyoi, O.K., Busher, P., Iraqi, F.A., 2006. Pathology of Tnf-deficient mice infected with *Plasmodium chabaudi adami* 408XZ. *Experimental Parasitology* 114, 271-278.
- Hisaeda, H., Yasutomo, K., Himeno, K., 2005. Malaria: immune evasion by parasites. *Int J Biochemistry of Cell Biology* 37, 700-706.
- IMGENEX 2007, posting date. Monoclonal Antibody to CD44, H-CAM (Clone 156-3C11). [Online.]
- Jandl, J.H., 1987. *Blood : textbook of hematology* Little Brown. Boston.

- Jaramillo, M., Gowda, D.C., Radzioch, D., Olivier, M., 2003. Hemozoin increases IFN-gamma-inducible macrophage nitric oxide generation through extracellular signal-regulated kinase- and NF-kappa B-dependent pathways. *Journal of Immunology* 171, 4243-4253.
- Keller, C.C., Yamo, O., Ouma, C., Ong'echa, J.M., Ounah, D., Hittner, J.B., Vulule, J.M., Perkins, D.J., 2006. Acquisition of hemozoin by monocytes down-regulates interleukin-12 p40 (IL-12p40) transcripts and circulating IL-12p70 through an IL-10-dependent mechanism: in vivo and in vitro findings in severe malarial anemia. *Infection and Immunity* 74, 5249-5260.
- Killick-Kendrick, R., Peters, W., 1978. *Rodent Malaria*. Academic Press, London.
- Kleemann, R., Hausser, A., Geiger, G., Mischke, R., Burger-Kentischer, A., Flieger, O., Johannes, F.J., Roger, T., Calandra, T., Kapurniotu, A., Grell, M., Finkelmeier, D., Brunner, H., Bernhagen, J., 2000. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature* 408, 211-216.
- Koury, M.J., Sawyer, S.T., Brandt, S.J., 2002. New insights into erythropoiesis. *Current Opinion in Hematology* 9, 93-100.
- Krucken, J., Mehnert, L.I., Dkhil, M.A., El-Khadragy, M., Benten, W.P., Mossmann, H., Wunderlich, F., 2005. Massive destruction of malaria-parasitized red blood cells despite spleen closure. *Infection and Immunity* 73, 6390-6398.
- Kumar, A., Angel, J.B., Daftarian, M.P., Parato, K., Cameron, W.D., Filion, L., Diaz-Mitoma, F., 1998. Differential production of IL-10 by T cells and monocytes of HIV-infected individuals: association of IL-10 production with CD28-mediated immune responsiveness. *Clinical and experimental immunology* 114, 78-86.
- Kurtzhals, J.A., Adabayeri, V., Goka, B.Q., Akanmori, B.D., Oliver-Commey, J.O., Nkrumah, F.K., Behr, C., Hviid, L., 1998. Low plasma concentrations of interleukin 10 in severe malarial anaemia compared with cerebral and uncomplicated malaria. *Lancet* 351, 1768-1772.
- Laloo, D.G., Shingadia, D., Pasvol, G., Chiodini, P.L., Whitty, C.J., Beeching, N.J., Hill, D.R., Warrell, D.A., Bannister, B.A., 2007. UK malaria treatment guidelines. *Journal of Infection* 54, 111-121.
- Lamb, T.J., Brown, D.E., Potocnik, A.J., Langhorne, J., 2006. Insights into the immunopathogenesis of malaria using mouse models. *Expert Rev Mol Med* 8, 1-22.
- Lamikanra, A.A., Brown, D., Potocnik, A., Casals-Pascual, C., Langhorne, J., Roberts, D.J., 2007. Malarial anemia: of mice and men. *Blood* 110, 18-28.
- Langhorne, J., Ndungu, F.M., Sponaas, A.M., Marsh, K., 2008. Immunity to malaria: more questions than answers. *Nature Immunology* 9, 725-732.
- Leng, L., Metz, C.N., Fang, Y., Xu, J., Donnelly, S., Baugh, J., Delohery, T., Chen, Y., Mitchell, R.A., Bucala, R., 2003. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *Journal of Experimental Medicine* 197, 1467-1476.
- Leng, L., Bucala, R., 2006. Insight into the biology of macrophage migration inhibitory factor (MIF) revealed by the cloning of its cell surface receptor. *Cell Research* 16, 162-168.
- Liu, Y., Pop, R., Sadegh, C., Brugnara, C., Haase, V.H., Socolovsky, M., 2006. Suppression of Fas-FasL coexpression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress response in vivo. *Blood* 108, 123-133.

- Lodoen, M.B., Lanier, L.L., 2006. Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Current Opinion in Immunology* 18, 391-398.
- Loharungsikul, S., Troye-Blomberg, M., Amoudruz, P., Pichyangkul, S., Yongvanitchit, K., Looareesuwan, S., Mahakunkijcharoen, Y., Sarntivijai, S., Khusmith, S., 2008. Expression of toll-like receptors on antigen-presenting cells in patients with falciparum malaria. *Acta Tropica* 105, 10-15.
- Longpré, B., 1994. *Les Anémies*. Les Presses de l'Université de Montréal, Montréal.
- Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T., Bernhagen, J., 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes and Infection / Institut Pasteur* 4, 449-460.
- Lue, H., Kapurniotu, A., Fingerle-Rowson, G., Roger, T., Leng, L., Thiele, M., Calandra, T., Bucala, R., Bernhagen, J., 2006. Rapid and transient activation of the ERK MAPK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on JAB1/CSN5 and Src kinase activity. *Cellular Signalling* 18, 688-703.
- Lue, H., Thiele, M., Franz, J., Dahl, E., Speckgens, S., Leng, L., Fingerle-Rowson, G., Bucala, R., Luscher, B., Bernhagen, J., 2007. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) promotes cell survival by activation of the Akt pathway and role for CSN5/JAB1 in the control of autocrine MIF activity. *Oncogene* 26, 5046-5059.
- Mackintosh, C.L., Beeson, J.G., Marsh, K., 2004. Clinical features and pathogenesis of severe malaria. *Trends in Parasitology* 20, 597-603.
- Martiney, J.A., Sherry, B., Metz, C.N., Espinoza, M., Ferrer, A.S., Calandra, T., Broxmeyer, H.E., Bucala, R., 2000. Macrophage migration inhibitory factor release by macrophages after ingestion of Plasmodium chabaudi-infected erythrocytes: possible role in the pathogenesis of malarial anemia. *Infection and Immunity* 68, 2259-2267.
- Mavoungou, E., Luty, A.J., Kremsner, P.G., 2003. Natural killer (NK) cell-mediated cytolysis of Plasmodium falciparum-infected human red blood cells in vitro. *European Cytokine Network* 14, 134-142.
- McDevitt, M.A., Xie, J., Shanmugasundaram, G., Griffith, J., Liu, A., McDonald, C., Thuma, P., Gordeuk, V.R., Metz, C.N., Mitchell, R., Keefer, J., David, J., Leng, L., Bucala, R., 2006. A critical role for the host mediator macrophage migration inhibitory factor in the pathogenesis of malarial anemia. *Journal of Experimental Medicine* 203, 1185-1196.
- Mehrotra, P.T., Donnelly, R.P., Wong, S., Kanegane, H., Geremew, A., Mostowski, H.S., Furuke, K., Siegel, J.P., Bloom, E.T., 1998. Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *Journal of Immunology* 160, 2637-2644.
- Menendez, C., Fleming, A.F., Alonso, P.L., 2000. Malaria-related anaemia. *Parasitology Today (Personal ed)* 16, 469-476.
- Miska, K.B., Fetterer, R.H., Lillehoj, H.S., Jenkins, M.C., Allen, P.C., Harper, S.B., 2007. Characterisation of macrophage migration inhibitory factor from Eimeria species infectious to chickens. *Molecular and Biochemical Parasitology* 151, 173-183.
- Mitchell, R.A., Metz, C.N., Peng, T., Bucala, R., 1999. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *The Journal of Biological Chemistry* 274, 18100-18106.

- Mitchell, R.A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J., Bucala, R., 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99, 345-350.
- Mohan, K., Stevenson, M.M., 1998a. Dyserythropoiesis and severe anaemia associated with malaria correlate with deficient interleukin-12 production. *British Journal of Haematology* 103, 942-949.
- Mohan, K., Stevenson, M.M., 1998b. Interleukin-12 corrects severe anemia during blood-stage *Plasmodium chabaudi* AS in susceptible A/J mice. *Experimental Hematology* 26, 45-52.
- Morand, E.F., Leech, M., Bernhagen, J., 2006. MIF: a new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nature Reviews Drug Discovery* 5, 399-410.
- Nakamaru, Y., Oridate, N., Nishihira, J., Takagi, D., Furuta, Y., Fukuda, S., 2005. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) contributes to the development of allergic rhinitis. *Cytokine* 31, 103-108.
- Nishihira, J., 2000. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): its essential role in the immune system and cell growth. *J Interferon Cytokine Res* 20, 751-762.
- O'Garra, A., Vieira, P., 2007. T(H)1 cells control themselves by producing interleukin-10. *Nature Reviews* 7, 425-428.
- Paul, R.E., Brey, P.T., 2003. Malaria parasites and red blood cells: from anaemia to transmission. *Molecules and Cells* 15, 139-149.
- Perlmann, P., Troye-Blomberg, M., 2002. Malaria and the immune system in humans. *Chemical Immunology* 80, 229-242.
- Petrache, I., Otterbein, L.E., Alam, J., Wiegand, G.W., Choi, A.M., 2000. Heme oxygenase-1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis in cultured fibroblasts. *American Journal of Physiology Lung Cellular Molecular Physiology* 278, L312-319.
- Reading, P.C., Whitney, P.G., Barr, D.P., Wojtasiak, M., Mintern, J.D., Waithman, J., Brooks, A.G., 2007. IL-18, but not IL-12, regulates NK cell activity following intranasal herpes simplex virus type 1 infection. *Journal of Immunol* 179, 3214-3221.
- Reyes, J.L., Terrazas, L.I., Espinoza, B., Cruz-Robles, D., Soto, V., Rivera-Montoya, I., Gomez-Garcia, L., Snider, H., Satoskar, A.R., Rodriguez-Sosa, M., 2006. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection and Immunity* 74, 3170-3179.
- Roetynck, S., Baratin, M., Johansson, S., Lemmers, C., Vivier, E., Ugolini, S., 2006a. Natural killer cells and malaria. *Immunological Reviews* 214, 251-263.
- Roetynck, S., Baratin, M., Vivier, E., Ugolini, S., 2006b. [NK cells and innate immunity to malaria]. *Medecine Sciences (Paris)* 22, 739-744.
- Roger, T., David, J., Glauser, M.P., Calandra, T., 2001. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 414, 920-924.
- Rusten, L.S., Jacobsen, S.E., 1995. Tumor necrosis factor (TNF)-alpha directly inhibits human erythropoiesis in vitro: role of p55 and p75 TNF receptors. *Blood* 85, 989-996.
- Saito, S., Nishikawa, K., Morii, T., Enomoto, M., Narita, N., Motoyoshi, K., Ichijo, M., 1993. Cytokine production by CD16-CD56bright natural killer cells in the human early pregnancy decidua. *International Immunology* 5, 559-563.

- Santos, L.L., Dacumos, A., Yamana, J., Sharma, L., Morand, E.F., 2008. Reduced arthritis in MIF deficient mice is associated with reduced T cell activation: down-regulation of ERK MAP kinase phosphorylation. *Clinical and Experimental Immunology* 152, 372-380.
- Sarfo, B.Y., Armah, H.B., Irune, I., Adjei, A.A., Olver, C.S., Singh, S., Lillard, J.W. Jr., Stiles, J.K., 2005. *Plasmodium yoelii* 17XL infection up-regulates RANTES, CCR1, CCR3 and CCR5 expression, and induces ultrastructural changes in the cerebellum. *Malaria Journal* 4, 63.
- Shi, X., Leng, L., Wang, T., Wang, W., Du, X., Li, J., McDonald, C., Chen, Z., Murphy, J.W., Lolis, E., Noble, P., Knudson, W., Bucala, R., 2006. CD44 is the signaling component of the macrophage migration inhibitory factor-CD74 receptor complex. *Immunity* 25, 595-606.
- Silverthorn, D.U., Ober, W.C., Garrison, C.W., Silverthorn, A.C., 2000. *Human physiology : an integrated approach*. Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Stevenson, M.M., Riley, E.M., 2004. Innate immunity to malaria. *Nature Reviews* 4, 169-180.
- Suh, K.N., Kain, K.C., Keystone, J.S., 2004. *Malaria* 170, 1693-1702.
- Takeda, K., Akira, S., 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *International Immunology* 17, 1-14.
- Taylor-Robinson, A.W., 1995. Regulation of immunity to malaria: valuable lessons learned from murine models. *Parasitology Today*, 11, 334-342.
- Tilg, H., Ulmer, H., Kaser, A., Weiss, G., 2002. Role of IL-10 for induction of anemia during inflammation. *Journal of Immunology* 169, 2204-2209.
- Toh, M.L., Aeberli, D., Lacey, D., Yang, Y., Santos, L.L., Clarkson, M., Sharma, L., Clyne, C., Morand, E.F., 2006. Regulation of IL-1 and TNF receptor expression and function by endogenous macrophage migration inhibitory factor. *Journal of Immunology* 177, 4818-4825.
- Toledo, F., Wahl, G.M., 2006. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nature Reviews* 6, 909-923.
- Vigano, P., Gaffuri, B., Somigliana, E., Infantino, M., Vignali, M., Di Blasio, A.M., 2001. Interleukin-10 is produced by human uterine natural killer cells but does not affect their production of interferon-gamma. *Molecular Human Reproduction* 7, 971-977.
- Vijaykumar, M., Naik, R.S., Gowda, D.C., 2001. *Plasmodium falciparum* glycosylphosphatidylinositol-induced TNF-alpha secretion by macrophages is mediated without membrane insertion or endocytosis. *The Journal of Biological Chemistry* 276, 6909-6912.
- Villeval, J.L., Lew, A., Metcalf, D., 1990. Changes in hemopoietic and regulator levels in mice during fatal or nonfatal malarial infections. I. Erythropoietic populations. *Experimental Parasitology* 71, 364-374.
- Vlachou, D., Schlegelmilch, T., Runn, E., Mendes, A., Kafatos, F.C., 2006. The developmental migration of *Plasmodium* in mosquitoes. *Current Opinion in Genetic Development* 16, 384-391.
- Waitumbi, J.N., Opollo, M.O., Muga, R.O., Misore, A.O., Stoute, J.A., 2000. Red cell surface changes and erythrophagocytosis in children with severe *plasmodium falciparum* anemia. *Blood* 95, 1481-1486.

- Weatherall, D.J., Miller, L.H., Baruch, D.I., Marsh, K., Doumbo, O.K., Casals-Pascual, C., Roberts, D.J., 2002. Malaria and the red cell. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. American Society of Hematology. 35-57.
- Webster, D.a.H., Adrian V.S., 2003. Progress with new malaria vaccines. Bull World Health Organ 81, 902-909.
- Weiss, G., Goodnough, L.T., 2005. Anemia of chronic disease. The New England journal of medicine 352, 1011-1023.
- West, P.W., Parker, L.C., Ward, J.R., Sabroe, I., 2008. Differential and cell-type specific regulation of responses to Toll-like receptor agonists by ISO-1. Immunology.
- WHO 2006a, posting date. Water-related diseases. [Online.]
- WHO 2006b, posting date. Roll Back Malaria. [Online.]
- WHO 2006c, posting date. Roll back Malaria. [Online.]
- Wickramasinghe, S.N., Abdalla, S.H., 2000. Blood and bone marrow changes in malaria. Baillieres Best Practice Research in Clinical Haematology 13, 277-299.
- Wiser, M.F., Lanners, H.N., Bafford, R.A., Favalaro, J.M., 1997. A novel alternate secretory pathway for the export of Plasmodium proteins into the host erythrocyte. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 94, 9108-9113.
- Wu, J., Cunha, F.Q., Liew, F.Y., Weiser, W.Y., 1993. IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. Journal of Immunology 151, 4325-4332.
- Xu, G., Shi, Y., 2007. Apoptosis signaling pathways and lymphocyte homeostasis. Cell research 17, 759-771.
- Yan, X., Orentas, R.J., Johnson, B.D., 2006. Tumor-derived macrophage migration inhibitory factor (MIF) inhibits T lymphocyte activation. Cytokine 33, 188-198.
- Yanagawa, Y., Onoe, K., 2007. Enhanced IL-10 production by TLR4- and TLR2-primed dendritic cells upon TLR restimulation. Journal of Immunology 178, 6173-6180.
- Yap, G.S., Stevenson, M.M., 1994. Inhibition of in vitro erythropoiesis by soluble mediators in Plasmodium chabaudi AS malaria: lack of a major role for interleukin 1, tumor necrosis factor alpha, and gamma interferon. Infection and Immunity 62, 357-362.
- Yoon, S.R., Chung, J.W., Choi, I., 2007. Development of natural killer cells from hematopoietic stem cells. Molecules and Cells 24, 1-8.
- Ziino, O., D'Urbano, L.E., De Benedetti, F., Conter, V., Barisone, E., De Rossi, G., Basso, G., Arico, M., 2005. The MIF-173G/C polymorphism does not contribute to prednisone poor response in vivo in childhood acute lymphoblastic leukemia. Leukemia 19, 2346-2347.